

**KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE PROTEİNLERİN
UBİKİTİNASYON BÖLGELERİNİN DÜŞÜK DERİŞİMLERDE
BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF UBIQUITINATION SITE OF PROTEINS
AT LOW CONCENTRATIONS BY MASS SPECTROMETRY**

ÜLKÜ GÜLER TOKAT

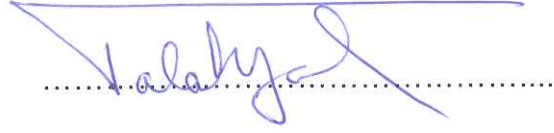
PROF. DR. BEKİR SALİH
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Haziran-2018

ÜLKÜ GÜLER TOKAT' ın hazırladığı “KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE PROTEİNLERİN UBİKİTİNASYON BÖLGELERİNİN DÜŞÜK DERİŞİMLERDE BELİRLENMESİ” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI' nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Talat YALÇIN
Başkan



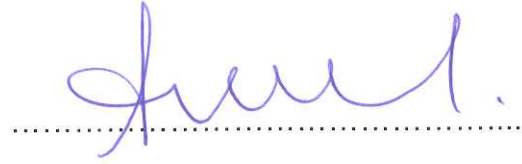
Prof. Dr. Bekir SALİH
Danışman



Prof. Dr. Mehmet SAÇAK
Üye



Prof. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI
Üye



Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 25.06.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

25 / 06 / 2018



Ülkü GÜLER TOKAT

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

07/06/2018

ÜLKÜ GÜLER TOKAT

ÖZET

KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE PROTEİNLERİN UBİKİTİNASYON BÖLGELERİNİN DÜŞÜK DERİŞİMLERDE BELİRLENMESİ

ÜLKÜ GÜLER TOKAT

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir Salih

Haziran 2018, 97 sayfa

Proteinlerin; fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon, ubikitinasyon ve diğer post-translasyonel modifikasyonları birçok hücresel işlevin ve hücre içi sinyal olaylarının düzenlenmesine olanak sağlamaktadır. Ubikitinasyon; birçok protein grubunun düzenlenmesi ve bozunmasında anahtar rol oynayan, çok fazla rastlanan bir post-translasyonel modifikasyon türüdür. Proteomiks alanında ubikitinasyon ve poliubikitinasyon analizleri, en aktif çalışma alanlarından biri olarak öne çıkmaktadır. Kanseri, metabolik sendromlar, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Huntington), inflamatuvar bozukluklar, otoimmünite (kendi dokularındaki antijenlere karşı antikor oluşması), enfeksiyon ve kas erimesi gibi hastalıkların başlangıç ve ilerlemelerinde ubikitinasyon aktif olarak rol almaktadır. Ubikitinasyona uğramış protein fonksiyonlarının anlaşılması için ubikitinasyon bölgelerinin tespit edilmesi ve bağlanma mekanizmalarının aydınlatılması, hastalıkların teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde son derece önemlidir. Hücrelerde, ubikitinasyon post-translasyonel modifikasyonuna uğramış protein düzeyi onların original haldeki derişimlerine göre oldukça düşük olduğundan, ubikitinasyon tayini ve ubikitinasyon bölgelerinin tespiti oldukça zordur. Ubikitinasyon bölgelerinin yüksek hassasiyet ile tayin edilmeleri, uygun bir zenginleştirme metodunu takiben gerçekleştirilen analizlerde en hassas ve güvenilir sonuçların elde edilebileceği kütle spektrometrik teknikler kullanılarak yüksek hassasiyetle yapılmaktadır. Tez kapsamında, öncelikle

Histon 2B peptidi ve ubiquitinasyona uğramış Histon 2B peptidi model olarak alınmış ve araştırma laboratuvarımızda bulunan matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaşmalı uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) kullanılarak çeşitli örnek hazırlama ve cihaz analiz parametreleri optimize edilerek çalışmayla ilgili temel analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda referans biyomoleküllere ait spektrumlardaki peptit sinyallerinin yorumlanması ile ubiquitinasyon post-translasyonel modifikasyonun kütle spektrometrik olarak izlenmesinin mümkün olduğu tespit edilmiştir. İleri çalışmalarda ise, ubiquitinasyon enzimi olarak kanser hücresi ölümünde ubiquitinasyonun rolünü aydınlatmak için bir E3 ubiquitin protein ligazı olan UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) seçilmiştir. UHRF1_siRNA' ları verilmiş RKO hücreleri ve kontrol RKO hücreleri üzerine yürütülen eş zamanlı proteomiks çalışmalarında yapılan veri analizlerinin sonuçlarına göre, siRNA eklenen hücrelerde UHRF1 down-regülasyonu gözlenmesi, UHRF1_siRNA'larının UHRF1'e özgü olduğunu kanıtlamıştır. İmmünoafinite çöktürme ile gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarından sonra tespit edilen ubiquitinasyona uğramış proteinlerin sayısında büyük bir artış gözlenmiştir. Dolayısıyla tripsin parçalaması sonucu elde edilen peptitler üzerinde ubiquitinasyon tayinine özgü etkin bir zenginleştirme işleminin gerçekleştirilmesinin şart olduğu sonucuna varılmıştır. Tezin son kısmında, amin fonksiyonel grupları içeren sol jel, poli-L-Lizin immobilize sol-jel, poli-L-arjinin immobilize sol-jel, poli-L-ornitin immobilize sol-jel, titanyum, zirkonyum ve tantalyum temelli sol-jeller, sülfonil grubu içeren anyonik yüzey, ipek ve son olarak pamuk malzemeleri monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin parçalanma ürünleri ile inkübe edilmiştir. Bu zenginleştirme amaçlı gerçekleştirilen deneyler sonucunda, ubiquitinasyon bölgesine ait sinyalin en iyi gözleendiği malzemenin sülfonil grubu içeren anyonik yüzey malzemesi olduğu ve ileri çalışmalarda ubiquitinasyona uğramış peptidlerin zenginleştirilme işleminde kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ubiquitinasyon, proteomiks, MALDI-ToF-MS, Histon 2B, UHRF1, siRNA, RKO, peptid zenginleştirme.

ABSTRACT

DETERMINATION OF UBIQUITINATION SITE OF PROTEINS AT LOW CONCENTRATIONS BY MASS SPECTROMETRY

ÜLKÜ GÜLER TOKAT

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bekir Salih

June 2018, 97 pages

Post-translational modifications of proteins, such as phosphorylation, glycosylation, acetylation, ubiquitination and the other various post-translational modifications allow the regulation of many cellular functions and intracellular signaling events. Ubiquitination is a very common post-translational modification that plays a key role in the regulation and degradation of many protein groups. Analysis of ubiquitination and polyubiquitination is one of the most active study area in the field of proteomics. Ubiquitination is actively involved in the onset and progression of diseases such as cancer, metabolic syndromes, neurodegenerative diseases (Alzheimer, Parkinson, Huntington), inflammatory disorders, autoimmunity (the formation of antibodies against their own antigens in tissues), infection and muscular dystrophy. Identification of ubiquitination sites and enlightenment of the binding mechanisms for understanding the functions of ubiquitinated proteins are crucial in the development of diagnostic and therapeutic methods for diseases. Since the level of post-translationally modified ubiquitinated proteins are very low in cells compared to their native forms, the detection of ubiquitination and ubiquitination sites is quite difficult. Analyzes needed for high sensitivity for the determination of ubiquitination sites are performed by using mass spectrometric techniques, where the most accurate and reliable results can be obtained in analyzes following a suitable enrichment method

prior to the mass spectrometric analyses. In the scope of this thesis, based on the Histon 2B peptide and ubiquitinated Histon 2B peptide, basic analysis of the study was performed by optimizing various sample preparation and instrumental analysis parameters using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). As a result of the analyses, it was determined that it is possible to observe the ubiquitination as a post-translational modification mass spectrometrically by interpreting the peptide signals in the spectra of the reference biomolecules. In the further studies, an E3 ubiquitin protein ligase UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) was selected as an ubiquitinating enzyme to elucidate the role of ubiquitination in cancer cell death. The downregulation of UHRF1 in UHRF1_siRNA transfected cells proved that UHRF1_siRNAs are specific to UHRF1 according to data analysis results of simultaneous proteomics studies on UHRF1_siRNA transfected RKO cells and control RKO cells. A significant increase in the number of detected ubiquitinated proteins was observed after the enrichment studies performed with the immunoaffinity precipitation. Therefore, it was decided that an efficient enrichment method for ubiquitination detection assay is required for the trypsin digested peptides. In the last part of the thesis, the poly-L-Lysine immobilized sol-gel, poly-L-arginine immobilized sol-gel, poly-L-ornithine immobilized sol-gel, titanium, zirconium based sol-gels, sulfonyl group containing surface, silk and finally, the cotton materials were incubated with the digestion products of the monoubiquitinated Histone 2B peptide. As a result of this enrichment experiments, it was found that the material with the best signal of ubiquitination region was sulfonyl group containing anionic surface material and could be used for the enrichment of ubiquitinated peptides in advanced studies.

Keywords: ubiquitination, proteomics, MALDI-ToF-MS, Histon 2B, UHRF1, siRNA, RKO, peptide enrichment.

TEŞEKKÜR

Bilimsel hayallerimin peşinden koşarken hem yüreklendiren hem de motivasyonumu hiçbir zaman kaybetmememi sağlayan umut ışığım, duruşu ile örnek aldığım, babacanlığı ile bana kendimi hep güvende hissettiren, saygıdeğer bilim adamı, değerli hocam Bekir Salih' e teşekkürlerin en içtenini ediyorum. Tüm sabrınız ve emeğinizle beni bu noktaya taşıdığınız için minnetarım, minnettar kalacağım. Sizin gibi bir insanla çalışmak hayattaki en büyük şanslarımdan biridir.

Meslektaşım, hocam, dostum, ağabeyim Mehmet Atakay' a, her konuda hep yanımda olduğu, en zor zamanlarımda desteğini esirgemediği, iki eli kanda olsa yardımına koştuğu için ne kadar teşekkür etsem azdır. Bilimsel destek gerçek dostlukla birleşince korkacak hiçbirsey olmadığını bana gösteren çok kıymetli Mehmet, iyi ki varsın.

SAREG ailesin çok değerli üyeleri, canım arkadaşlarım, değerli hocalarım... Sizler sayesinde tez çalışmalarımı mutluluk dolu laboratuvar ortamımızda gerçekleştirebildim. İçtenliğinizi, neşenizi, desteğinizi esirgemediğiniz için ne kadar teşekkür etsem azdır.

Yurtdışı çalışmalarımın finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu' na teşekkürlerimi sunarım.

Karolinska Enstitüsü'nde gerçekleştirdiğim çalışmalarda laboratuvarının kapısını bana açan Prof. Dr. Roman Zubarev' e, çalışmalarımı birlikte yürüttüğüm, değerli bilgilerini ve arkadaşlığını benimle paylaşan Amir Ata Saei' e teşekkürü borç bilirim.

Çocukluğumdan beri hep yanımda olan, kardeşten öte canım dostlarım 'İlkadım Çocukları' na, lise ve üniversite yıllarımda hayatıma giren canım arkadaşlarıma, çalışma hayatımda tanıdığım güzel dostlarıma, güvenleri ve destekleri için en içten şekilde teşekkür ederim.

Bana hayatta hiçbir zaman yalnız kalmayacağımı, iyi kötü her anımda elimi tutacaklarını, nerede olursam olayım tüm kalpleriyle benimle olacaklarını hissettirmeyi eksik etmeyen ' AİLEM'... Size ne kadar teşekkür etsem azdır. Çok şanslıyım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ubikitin ve Ubikitinasyon	4
2.2. Ubikitinasyon Bölgesi Tayini	7
2.3. Tek Bir Protein İçin Ubikitinasyon Bölgesinin Belirlenmesi.....	8
2.4. Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanmasında Kütle Spektrometrisi Temelli Proteomik Yaklaşımlar	9
2.4.1. Ubikitinasyon Bölgelerinin Kütle Spektrometrisi İle Tanımlanmasının İlkeleri	9
2.4.2. Ubikitinasyon Bölgelerinin MALDI-TOF-MS İle Tanımlanması	12
2.4.3. LC-MS/MS İle Hedef Proteinin Ubikitinasyon Bölgelerinin Belirlenmesi ..	14
2.5. Proteom Düzeyinde Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanması	15
2.5.1. Hücrelerde Ubikitinasyona Uğramış Proteinlerin İzolasyonunda Ubikitin Etiketlenmesi	15
2.5.2. Ubikitinasyona Uğramış Proteinlerin İzole Edilmesinde Anti-Ubikitin Antikorlarının Kullanımı	19
2.5.3. Ubikitin Bağlanma Bölgeleri Üzerinden Poliubikitinasyona Uğramış Proteinlerin Tanımlanması.....	21
2.6. Proteom Düzeyinde Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanması İçin Ubikitin Kalıntılarının Profillenmesi	23
2.6.1. Anti-Diglisin Lizin Antikorlarının Geliştirilmesi	23
2.6.2. Diglisin Modifiye Lizinleri Hedefleyen Monoklonal Antikorların Üretim Stratejileri	24
2.6.3. Anti-Diglisin Lizin Antikorlarının Karakterizasyonu.....	24
2.7.1. Ubikitin Kalıntısı İçeren Peptidlerin Anti-Diglisin Lizin Antikorları ile İmmünoçöktürülmesi	26

2.7.2. Ubikitinasyon Bölgelerinin Yanlış Keşif (False-Positive) Tanımlanmasını Azaltmak İçin Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrelerinin Kullanılması	28
2.7.3. İzobarik Modifikasyonu Azaltmak İçin Kütle Spektrometresi Veritabanı Araması ve Örnek Hazırlamanın İyileştirilmesi	28
2.8. C-Terminalinden Diglisin İle Modifiye Edilmiş Lizin İle Peptitlerin Tanımlanması	29
2.9. Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanmasının İyileştirilmesi İçin Proteomik Teknikler	30
2.10. Ubikitin Kalıntısı Profillemeye Yaklaşımının Kısıtlaması	30
2.11. Ubikitin Kalıntısı Profillemeye Tekniğinin Uygulamaları	31
2.12. Protein Ubikitinasyonunun Farklı Düzenleyici Fonksiyonlarının Keşfi	31
2.13. Özgün E3 Ligazları Tarafından Düzenlenmiş Ubikitinasyon İşlemlerini Profillemeye	32
2.14. Ubikitin Kalıntısı Görüntüleme Yaklaşımının Gelecekteki Uygulamaları	33
2.14.1. Belirli Ubikitin Zinciri Bağlantısıyla Ubikitinasyon İşlemlerinin Belirlenmesi	33
2.14.2. Hücre Sinyal Yollarıyla Oluşan Ubikitinasyon İşlemlerinin Tayini	33
2.14.3. Ubikitin Proteazom Sistemindeki Etkileşim Ağının Aydınlatılması	33
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35
3.1. Bölüm 1: Protein Ubikitinasyonunun Referans Biyomoleküller Üzerinde Kütle Spektrometrik Olarak İncelenmesi	35
3.1.1. Referans Peptit Üzerinde Sıcaklığın Özgün Olmayan Ubikitinasyon Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi.....	38
3.2. Bölüm 2: Kütle Spektrometrik Yöntemlerle Kansere Hücrelerinde Ubikitin Protein Ligazlarının Rollerinin Aydınlatılması	41
3.2.1. Ubikitinasyon Veri Analizi	41
3.2.2. Ubikitinasyon Üzerine Kurulan Hipotez	42
3.2.3. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış Rko Hücrelerinde Hücre Canlılığı Tayini.....	43
3.2.4. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış Ve İlaç Verilmiş RKO Hücrelerinde Hücre Canlılığı Tayini	44
3.2.5. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri Üzerinde Etiketsiz Proteomiks Çalışması.....	44
3.2.6. Ubikitin Kalıntı Motifi (K-E-GG) İmmünoafinite Küreleri' Ni Kullanılarak Hücre Lizatlarından Ubikitinasyona Uğramış Peptitlerin Zenginleştirilmesi İçin UHRF1 siRNA Transefeksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri Ve Kontrol RKO Hücreleri Üzerinde Gerçekleştirilen Proteomiks Çalışmaları	46

3.2.7. Ubikitinasyona Uğramış Proteinleri Ve Peptitleri Belirlemek Amacıyla HCT116, RKO AND A375 Hücreleri Üzerinde Gerçekleştirilen Proteomiks Çalışmalarının Veri Analizleri	48
3.2.8. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış Hücrelerde Hücre Canlılığı Testi Sonuçları	48
3.2.9. UHRF1 siRNA ve İlaç Transfeksiyonu Yapılmış Hücrelerde Hücre Canlılığı Testi Sonuçları	49
3.2.10. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri Üzerinde Etiketsiz Proteomiks Çalışması Sonuçları	54
3.2.11. Ubikitin Kalıntı Motifi (K-E-GG) İmmünoafinite Küreleri' Ni Kullanılarak Hücre Lizatlarından Ubikitinasyona Uğramış Peptitlerin Zenginleştirilmesi İçin UHRF1 SİRNA Transefeksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri Ve Kontrol RKO Hücreleri Üzerinde Gerçekleştirilen Proteomiks Çalışmaları Sonuçları	55
3.3. Bölüm 3: Ubikitinasyona Uğramış Peptidlerin Zenginleştirilmesi İçin Kullanılabilecek Yüzeylerin Belirlenmesi	60
3.3.1. Kullanılan Yüzeyler	61
3.3.2. Sülfonik Asit Fonksiyonel Grubu İçeren Adsorban Üzerinde Zenginleştirme	61
3.3.3. Metal İçeren Sol-Jel Yüzeylerde Zenginleştirme.....	63
3.3.4. PAMUK ve İPEK ÜZERİNDE ZENGİNLEŞTİRME	66
3.3.5 Poli-L-Lizin, Poli-L-Arjinin, Poli-L-Ornitin İçeren Sol-Jel Malzemeleri İle Zenginleştirme	68
4. SONUÇLAR.....	73
4.1. Bölüm 1 İçin Sonuçlar	73
4.2. Bölüm 2 İçin Sonuçlar	74
4.3. Bölüm 3 İçin Sonuçlar	76
5. KAYNAKLAR	77
EKLER.....	88
ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ubikitinin hedef protein bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi.	7
Şekil 2.2. Farklı proteazlar ile parçalanan ubiquitinasyona uğramış proteinden elde edilen peptidler.	11
Şekil 2.3. Etiketlenmiş ubiquitin üzerinden afinite zenginleştirilmesi ile ubiquitinasyon bölgelerinin tayini.	19
Şekil 2.4. Proteome analizinde ubiquitinasyon bölgelerinin tayini için ubiquitin kalıntısı görüntüleme tekniğinin şematik gösterimi.	27
Şekil 3.1. Histon 2B peptidinin enzimatik parçalama sonrası pozitif iyon ve lineer modda MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi. Histon 2B YTSSK peptidine ait sinyal ve Histon 2B AVSEGTK peptidine ait sinyal.	36
Şekil 3.2. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalama sonrası pozitif iyon ve lineer modda MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi. Ubikitine ait peptit sinyallerini göstermektedir ve Histon 2B AVSEGTK peptidine ait sinyal.	37
Şekil 3.3. (A) 2 mg/mL Histon 2B - 0.13 mg/mL Ubikitin 1:1 (v/v) karışımına ait pozitif iyon ve lineer modda elde edilen MALDI-Kütle spektrumu. (B) 60 °C' de ikübe edilen 2 mg/mL Histon 2B - 0.13 mg/mL ubiquitin 1:1 (v/v) karışımının pozitif iyon ve lineer modda elde edilen MALDI-Kütle spektrumu. Histon 2B YTSSK peptidine ait sinyal, Histon 2B AVSEGTK peptidine ait sinyal ve ubiquitine ait peptit sinyallerini göstermektedir.	40
Şekil 3.4. UHRF1_siRNA' lara maruz kalan RKO hücreleri canlılık testi sonucu. Gösterilen değerler siRNA verilmemiş hücrelere ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.	49
Şekil 3.5. UHRF1_siRNA transfeksiyonu yapılmış RKO hücrelerinde hücre canlılığı testi sonucu. Gösterilen değerler siRNA verilmemiş kontrol hücrelerine ait veri %100 alınıp normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.	50

Şekil 3.6. UHRF1 siRNA' ları varlığında ve yokluğunda MTX' e maruz kalan RKO Hücreleri üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı testi sonuçları. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.	51
Şekil 3.7. UHRF1 siRNA' ları varlığında ve yokluğunda 5FU' ya maruz kalan RKO Hücreleri üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı testi sonuçları. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.	52
Şekil 3.8. UHRF1 siRNA' ları varlığında ve yokluğunda PCTL' ye maruz kalan RKO Hücreleri üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı testi sonuçları. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.	53
Şekil 3.9. UHRF1_ siRNA verilmiş RKO Hücrelerinde etiketsiz proteomiks çalışması. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.	54
Şekil 3.10. Ubikitinasyona uğramış Peptitletin Antikor Kullanılarak Zenginleştirilmesi ve Proteomik Analizi.	56
Şekil 3.11. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik analiz sonuçlarına göre hesaplanan CV değerlerine göre tekrarlanabilir protein sayısı.	58
Şekil 3.12. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik analiz sonuçlarına göre hesaplanan CV değerlerine göre tekrarlanabilir peptit sayısı.	60
Şekil 3.13. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin sülfonil fonksiyonel grupları içeren malzeme ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS analiz spektrumları.	88
Şekil 3.14. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin geçiş metal temelli sol-jeller ile zenginleştirilmesinin sonraki MALDI-TOF-MS spektrumları.	64

Şekil 3.15. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin Zr temelli sol-jel ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları..... 89

Şekil 3.16. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin ipek malzemesi ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları..... 90

Şekil 3.17. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin pamuk malzemesi ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları..... 91

Şekil 3.18. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin PLL, PLA, PLO immobilize sol-jeller ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve zenginleştirme öncesi elde edilen sinyallerin karşılaştırıldığı MALDI-TOF-MS spektrumları. 70

Şekil 3.19. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin PLL immobilize sol-jel ile zenginleştirilmesinden elde edilen ve (B) zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları..... 71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Ubikitinasyon bölgelerinin proteomik tanımlanması için ubikitinasyona uğramış proteinlerin izolasyonunda kullanılan üç farklı yaklaşımın karşılaştırılması. 22

Tablo 3.1. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik protein analiz sonuçları. 57

Tablo 3.2. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik peptit analiz sonuçları. 59

Tablo 3.3. Metal içeren sol-jellerin sentezleri sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları..... 63

SİMGELER VE KISALTMALAR

5FU	: 5-fluorouracil
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparajin
BCA	: Bikinkoninik Asit
CAD, CID	: Çarpışmayla Aktive Edilmiş Ayrışma
CV	: Varyasyon Katsayısı
Da	: Dalton
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Besiyeri
DTT	: Ditiyotieritol
DUB	: Deubikitinasyon Enzimi
ESI-QTOF	: Elektrosprey İyonlaşmalı Kuadrapol Uçuş Zamanlı
ETD	: Elektron Transferli Ayrıştırma
FA	: Formik Asit
FBS	: Fetal Sığır Serumı
Gly	: Glisin
HCD	: Yüksek Enerjili Ayrıştırma
HCT	: İnsan Kolon Kanseri Hücresi
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-etansülfonik asit
IAA	: İyodoasetamid
IAP	: İmmünoafinite Çöktürme
Leu	: Leusin
Lys	: Lizin

MALDI-TOF-MS: Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi

MOPS	: 3-(N-morfolino)propansülfonik asit
MTX	: Methotrexate
NCE	: Normalize Edilmiş Çarpışma
PCTL	: Paclitaxel
PTM	: Post-Translasyonel Modifikasyon
RKO	: Kolorektal Kolon Kanseri Hücresi
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
siRNA	: Küçük Engelleyici Ribonükleik Asit
TFA	: Trifloroasetik asit
Trp	: Triptofan
UBD	: Ubikitin Bağlayıcı Bölge
UHRF1	: Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
UIM	: Ubikitin Etkileşimli Motif
UPS	: Ubikitin-Proteazom Sistemi

1. GİRİŞ

Protein ubiquitinasyonu, ökaryotlarda hücresel fonksiyonların ve birçok hücre sinyal yolunun neredeyse her yönünü düzenleyen önemli bir post-translasyonel modifikasyon (PTM) türüdür. Protein ubiquitinasyonundaki değişiklikler, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, immünolojik bozukluklar ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalıkla bağlantılıdır [1]. Bu tür hastalıklarda ve hücre sinyal yollarında ubiquitinasyonun rolünün önemini anlamak için, ubiquitinasyona uğramış proteinleri ve onların modifikasyon bölgelerini tayin etmek gerekir. Ubikitin-aktif edici enzim (E1), ubiquitin taşıyıcı protein (E2) ve ubiquitin protein ligazı (E3) olmak üzere ubiquitinasyondan sorumlu üç enzim vardır [2]. Ubikitin-proteazom yolu, ökaryotik hücrelerdeki çoğu hücresel proteini parçalamaktadır. Ubikitinasyonun ve ubiquitinasyon aracılığı ile gerçekleşen proteolizin hücre büyümesinde ve tümör oluşumundaki kritik rolleri nedeniyle, bu süreçlerde yer alan bileşenlerin hedeflenmesi kanser tedavisi araştırmaları için güçlü bir yaklaşımdır [3]. Hedef proteinler içindeki ubiquitinasyon bölgelerinin in vivo olarak tanımlanması için kütle spektrometrisinin kullanılması, ubiquitinasyonun protein fonksiyonunu değiştirdiği yolların daha iyi anlaşılmasına imkan sağlamaktadır. Bu nedenle protein ubiquitinasyonunun tanımlanmasında yaygın olarak uygulanabilecek protein ubiquitinasyonu tanımlama yaklaşımlarının geliştirilmesi oldukça kritik bir noktadır [4]. Ubikitinasyon bölgeleri, ubiquitinden türetilmiş ubiquitinin özgün kısımlarının bağlı olduğu peptidlerin tespiti yoluyla kütle spektrometresi (MS) kullanılarak tayin edilebilmektedir. C terminalinde KESTLHLVLRRLRG aminoasit dizilimine sahip ubiquitindeki son glisinin, hedef protein üzerindeki lizin amino asitinin yanzincirindeki amin gurubuna konjugasyonu gerçekleşebilir. Hedef proteinlerde, konjuge ubiquitinde ya da serbest ubiquitinde bulunan Arginin (Arg) ve Lizinin (Lys) 'in karboksil kısmındaki peptid bağları, bu aminoasitler modifikasyona uğramadığı sürece tripsin tarafından kırılır. Konjuge edilmiş ubiquitin tripsin ile parçalara ayrıldığında, modifiye edilmiş lizin kalıntıları üzerinde iki Glisin (Gly) kalıntısı bırakır ve yeni bir peptid oluşturur. Bu

peptidlere "ubikitin kalıntısı içeren peptidler" veya "ubikitin imza peptidleri" adı verilir. Bu diglisin eklentisinin monoizotopik kütlesi 114. 04 Da' dur. Bazı çok nadir durumlarda tripsin, Arg ile Leu arasındaki peptid bağına keser, ancak konjuge edilmiş ubikitin üzerindeki Arg ve Gly arasındaki bağı atlar ve kesemez. Bu nedenle, dört aminoasitlik bir peptid, LRGG, modifikasyon bölgelerinde 383. 23 Da' luk bir monoizotopik kütle eklentisi oluşturarak substratlar üzerine tutunur. Hücrelerde ubikitinasyona uğramış proteinlerin az miktarda olması nedeniyle genellikle bu proteinleri ve bunların modifikasyon bölgelerini başarıyla tanımlamak için bir zenginleştirme basamağı gerekmektedir. Tripsin ile parçalamaya uğratılmış hücre örneklerinde, ubikitinasyona uğramış proteinlerden elde edilen peptidlerdeki lizin üzerinde bulunan diglisin etiketine özgü olarak üretilen antikolar, ubikitinasyona uğramış peptidleri zenginleştirmek için kullanılır. Ubikitinlenmiş lizin yan zincirlerine sahip proteinlerin tripsin ile parçalanması sonucu üretilen Lys-Gly-Gly (K-GG) kalıntısını tanıyan antikoların üretimi ve erişilebilirliğindeki son gelişmeler, zenginleştirme ve kütle spektrometresi ile übikitinasyon bölgelerini tayin etme kabiliyetini geliştirmiştir [5]. Ubikitin kalıntısı profillemeye tekniği doğrudan E3 ligazlarının substratlarını belirleyebilmektedir. Belirli bir E3 ligazının hedef proteinlerini tanımlamak bu biyomoleküllerin potansiyel bir tedavi edici ajan olup olmadıklarının belirlenmesi açısından oldukça büyük bir önem taşır [1]. Hidroksipropil, izoleusil, leusil, asparajil, ornitil ve aspartil gibi pek çok modifikasyon, 2,0 Daltonluk (Da) bir kütle doğruluğu aralığında diglisin modifikasyonuna izobariktir. Bu izobarikliğin ne olduğunu burada açıklamalıyız. Güvenilir bir ubikitinasyon bölgesinin tanımlanmasının yapılabilmesi açısından Orbitrap gibi yüksek kütle ayırıcılığında ve 10 ppm veya 1 ppm'in altında kütle doğruluğu sağlayan kütle spektrometrelerinin kullanılması gerekmektedir. Bu cihazlar hata bulma oranını önemli ölçüde azaltabilir ve farklı iyon parçalama tekniklerinin de kullanılmasına olanak sunarak ubikitinasyon bölgeleri kolaylıkla tayin edilebilir [1]. Tamamlayıcı gaz fazında iyon parçalama tekniklerinin kullanılması karmaşık örneklerde protein tanımlamalarının geçerliliğini ve özgünlüğünü artırır [6].

Tez kapsamında, standart peptidler ve RKO hücreleri üzerinde MALDI-TOF ve ESI-Orbitrap kütle spektrometresi cihazları kullanılarak protein ubikitinasyonu tayini ve modifikasyon bölgelerini belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ESI-Orbitrap kütle

spektrometresi cihazının yüksek ayırıcılık gücünün farklı fragmentasyon yöntemleri ile birleşmesiyle modifikasyon tayini için en etkin yöntem olduğu çalışmalarımızda belirlenmiştir. Histon 2B ve monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda protein ubiquitinasyonu kütle spektrometrik olarak incelenmiştir. Kolon kanseri (rectal colon carcinoma, RKO) hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalardan önce, ilgi çekici bazı ubiquitinasyon ve deubikitinasyon enzimleri üzerine hipotezler kuruldu. Bu enzimlerden Ubiquitin-Like PHD And RING Finger Domain-Containing Protein 1 (UHRF1) üzerinde çalışılmaya karar verilmiştir. Bu kapsamda, proteomiks çalışmaları, bazı kanser ilaçları varlığında ve yokluğunda iki ayrı UHRF1_siRNA ile susturulan RKO hücreleri ve kontrol RKO hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. UHRF1_siRNA verilmiş RKO hücreleri ve kontrol RKO hücreleri üzerindeki proteomiks çalışmaları sonrasında, daha fazla ubiquitinasyona uğramış proteinleri tanımlamak ve UHRF1 enziminin downregülasyonundan etkilenen proteinleri belirlemek amacıyla ubiquitinlenmiş peptidlerin zenginleştirilmesi için 'Ubiquitin Remnant Motif (K-E-GG) İmmünoafinite Küreleri' kullanılmıştır. Q Exactive Plus-LC Orbitrap Kütle Spektrometresinde yüksek enerjili ayrıştırma (HCD) ile, Fusion-LC Orbitrap Kütle Spektrometresinde HCD ve elektron transferli ayrıştırma (ETD)-HCD yöntemleri ile peptid analizleri gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresinden elde edilen veriler Max-Quant ve Quanti proteomiks yazılım sistemleri ile analiz edilerek ubiquitinasyona uğramış proteinler tanımlanmıştır. Son olarak, ubiquitinasyona uğramış peptidlerin zenginleştirilmesine yönelik kullanılabilecek potansiyel yüzeyler üzerinde monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin zenginleştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İleri çalışmalar için, kütle spektrumlarında, ubiquitinasyon bölgesine ait sinyalin gözlenebildiği en uygun yüzey belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

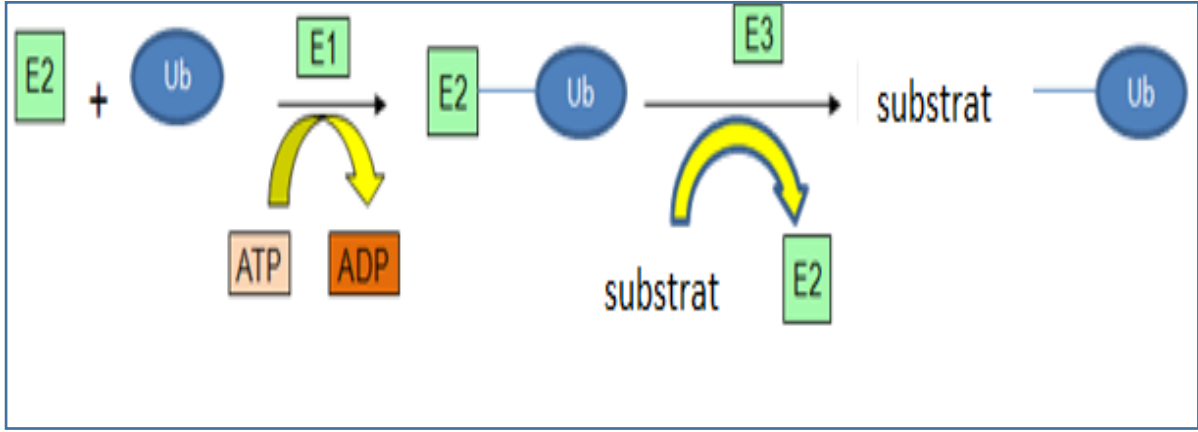
2.1. Ubikitin ve Ubikitinasyon

“Proteom” terimi, belirli bir zaman ve yaşamsal faaliyette hücrenin veya organizmanın sahip olduğu proteinlerin tümünü tanımlamak için kullanılmaktadır. Proteomiks kelimesi ise 1995 yılından beri hücrelerin, dokuların ya da biyolojik sıvıların protein bileşenlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. -Omiks eki, geniş kapsamlı biyolojik sistem çalışmalarını ifade etmektedir. Gen çalışmalarını ifade eden genomiks, farklı şekilde kodlanmış proteinler hakkında post-translasyonel modifikasyonlar nedeniyle tamamıyla bilgi sağlayamamaktadır. İnsan genomu tarafından kodlanan proteinlerin gerçek sayısının sadece genomik bilgilere bakılarak belirlenebilmesi mümkün değildir. Bir genin farklı protein izoformları oluşabilir. Bir gen tarafından sentezlenen protein, bölünme ve translasyona bağlı olarak farklı fonksiyon ve özelliklere sahip olabilmektedir [7]. Farklı hücrelerde bulunan farklı proteinler üzerinde modifikasyonlar meydana gelebilir. Bu karmaşıklık ancak detaylı proteomik analizler yapılarak genom ve proteom hakkında işe yarar ve doğru bilgiler elde edilmesiyle çözümlenebilir. Yani genomik alanında elde edilen verilerin proteinler ile ilgili elde edilen veriler ile desteklenmesi gereklidir. Bunlar ve benzeri sebeplerden dolayı proteinler üzerinde ayrıntılı çalışmaların gerçekleştirilmesi ve hücre fonksiyon mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik proteomiks alanında aydınlatıcı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Proteomiks hızlı ilerleme gösteren bir araştırma alanıdır [8]. Özellikle hastalıkların tanı ve tedavisinde kritik rol oynayan ve genelde serum, salya, idrar gibi doğal örneklerde tayinlerini zorlaştıracak kadar düşük miktarlarda bulunan proteinlerin yapı, fonksiyon, birbirleri ile etkileşimleri, oluşturdukları kompleksler ve lokalizasyonlarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar proteomiks alanında oldukça büyük önem taşımaktadır. Son dönemde proteomik veri analizi ve proteomik teknik uygulamalarında meydana gelen gelişmeler, klinik alanda hastalıkların erken teşhis edilebilmesine olanak sağlanması açısından umut vadetmektedir [7]. Proteomiks alanında en çok dikkat çeken kısım hücre faaliyetlerinde yer alan proteinlerin yapısal olarak uğradıkları değişimler ya da hücresel faaliyeti gerçekleştirebilmek adına

protein yapılarında gerçekleşen modifikasyonlar üzerine yapılan çalışmalardır. Protein sentezinin translasyon basamağının ardından gerçekleşen bu değişimler post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) olarak adlandırılır. Proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları; hücresel farklılaşma [9], protein yıkımı [10], sinyal verici ve düzenleyici işlemler [11], gen ifadesinin düzenlenmesi ve protein-protein etkileşimleri gibi konularda oldukça önemli bir yere sahiptir. Proteinlerin geri dönüşümlü post-translasyonel modifikasyonları proteoma ciddi anlamda fonksiyonel çeşitlilik ve hareketlilik sağlar. En sık rastlanılanları fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon olmak üzere, canlı hücrelerinde 300'den fazla post-translasyonel modifikasyon çeşidi gözlenmektedir [12].

Ubikitin, 1970'lerin başlarında keşfedilmiştir ve daha sonra, moleküler ağırlığı, substratları ve lizozom sisteminden ayrımı ile ilgili olarak, 26S proteazomu olarak adlandırılan, çokluenzimatik kompleksi tarafından bozulan hücre içi proteinleri etiketleyen molekül olarak kabul edilmektedir. Daha sonra, ubikitin bağlanmasındaki farklılıkların proteoliz olmadan protein fonksiyonunu etkileyebileceği fark edildi [13]. Ubikitin moleküllerinin substrat proteinlerine kovalent bağlanması, substratın, proteazom tarafından yok edilmesine ya da substrat aktivitesindeki bir değişikliğe, farklı bir lokalizasyona, bağlanacağı moleküllere ya da diğer proteolitik olmayan olaylara karşı afinitesinin değişmesine neden olur. Protein ubiquitinasyonu tarafından sağlanan hücresel olayların sonucunda görülen çeşitlilikler, hücrelerdeki ubikitin sisteminin önemini vurgulamaktadır. Ubikitin 76 amino asit içerir ve C-terminali aracılığıyla substrat proteinine veya kendisine, E1 ubikitin aktivasyon enzimleri, E2 ubikitin-konjugasyon enzimleri ve E3 ubikitin-ligand enzimleri olarak adlandırılan üç farklı enzimin ardışık hareketi ile kovalent olarak bağlanır. E1 enzimleri, ubikitin C-ucunu aktive ederler ve bir E1-ubikitin tiyoester ara ürünü oluştururlar. E2 enzimleri aktive olmuş ubikitini E1-ubikitin tiyoester ile bir transtiyolasyon reaksiyon vererek toplarlar ve bir E2-ubikitin tiyoester ara maddesi oluştururlar. E3 enzimleri ubiquitinasyonu sağlamak için hem E2-ubikitin tiyoesterlerini hem de substratları ile yapı iskelesi kurarlar ya da substrat konjugasyonundan önce bir E3-ubikitin tiyoester ara ürünü oluştururlar. Proteomiks çalışmalarındaki son gelişmeler ile ubiquitinasyon yolu sisteminin anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Ubikitin C-terminalinin E1 tarafından aktivasyonu, ubiquitinasyon yolunun tek enerji tüketen adımıdır. Ubikitin E1

enzimleri üzerindeki yapı fonksiyonu çalışmaları, aktivasyon sürecinin çoklu mekanistik detaylarını ortaya çıkarmaktadır. Kısacası, E1'ler adenilasyon bölgesi, katalitik sistein bölgesi ve ubiquitin katlanma bölgesi olmak üzere çok bölgeli bir yapıya sahiptir. Aktif adenilasyon bölgesini katalitik sistein bölgesi ile birleştiren uzun bir esnek bağlayıcı, E1 enzimleri tarafından gerçekleştirilen ubiquitin ayrımcılığında yer alan önemli kalıntıları taşır. E1'deki konformasyonel düzenlenme, E2 katalitik sisteminin, E2-ubiquitin bağlantısının sağlanmasına neden olan E1 ubiquitin tiyoesterine saldırmasını kolaylaştırır. Ubiquitin, ubiquitin aktive edici enzimlerler olan (ubiquitin activating enzymes, UBA) UBA1 ve UBA6 tarafından aktive edilebilir. E2 konjugat enzimleri olası N-terminal ve C-terminal uzantıları ile birlikte bir çekirdek ubiquitin konjugasyon (UBC) kıvrımını paylaşır. Son olarak, E6-AP C-terminaline (E6-AP C-terminus, HECTs), gerçekten ilginç yeni genlere (really interesting new genes, RING'ler) ve RBR'lere homolog olan enzimatik mekanizmalarına göre sınıflandırılmış üç farklı E3 ubiquitin ligaz sınıfı vardır. E3 ligaz ailesinin (~600 üyeli) en büyüğü olan RING bölge ligazları, ubiquitin E2'den substrata doğrudan transferini sağlar [3]. Proteinler, tek bir ubiquitin molekülü (monoubikitinasyon) veya ubiquitin polimeri (poliubikitinasyon) ile bir veya daha fazla lizin (K) üzerinden modifiye edilebilir. Bir ubiquitin zincirinde, ubiquitin, belirli bir polimerin oluşması için sayısız olasılık sunan, lizin üzerine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 ve K63) veya metioninin N-terminaline konjuge edilebilir. Sadece tek bir bağlantı tipini içeren ubiquitin zincirlerine homotipik denir. Aksine, heterotipik zincirler aynı polimer içinde karışık bağlantılar içerir. Ubiquitin zincirlerindeki çeşitlilikler heterotipik zincirlerin ayrıca dallanmasına sebep olabilir. Yani, bir ubiquitin molekülü iki ya da daha fazla yerden ubiquitinasyona uğrayabilir. Ayrıca, ubiquitin molekülleri, bir başka ubiquitin sinyal düzenlemesine ve/veya çeşitlendirilmesine sebep olan, asetilasyon ve fosforilasyon dahil olmak üzere diğer post-translasyonel modifikasyonlarla da modifiye edilebilir [14].



Şekil 2.1. Ubikitinin hedef protein bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi.

2.2. Ubikitinasyon Bölgesi Tayini

Ubikitinasyonun biyolojik işlevini ve hastalıklardaki rollerini anlamak için, protein ubikitinasyon bölgelerini tanımlamak oldukça önemlidir. Protein ubikitinasyonundaki kusurlar kanser [15-17] nörodejeneratif hastalıklar [18-21], kalp-damar hastalıkları [22, 23] ve iltihaplanma [24-26] gibi birçok hastalığa neden olabilir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, bu hastalıklardaki protein ubikitinasyonunun rolü bir çok açıdan aydınlatılmış olmasına rağmen, bu hastalıklara dahil olan mekanizmaların ve moleküler yolların belirlenmesi alanındaki çalışmalar hala oldukça zordur. Bu hastalıklardaki yaygın bir özellik, genellikle ubikitin ligazlarının veya deubikitinasyon enzimlerinin (DUB) [15-19] anormal aktivitelerinden kaynaklanmaktadır ve bunlar substrat özgünlüğünü ve ubikitinasyonun dinamik olarak düzenlenmesini belirlemektedir. Bu enzimler, protein ubikitinasyonunda başlıca oyuncular olduğundan, bu enzimler tarafından düzenlenen ubikitinasyona uğramış proteinleri ve bunların modifikasyon bölgelerini belirlemek oldukça önemlidir. Bu enzimlerin substratlarını bilmek, ubikitin ile ilişkili hastalıkların mekanizmalarını araştırmak için yaklaşımlar geliştirmeye ve dolayısıyla bunları tedavi etmek için yeni terapötik strateji geliştirmeye yardımcı olabilir. Aşağıdaki nedenlerden dolayı ubikitinasyon bölgelerini tanımlamak özellikle oldukça zordur. Birincisi, ubikitinasyona uğramış proteinlerin bolluğu, normal fizyolojik koşullar altında hücrelerde onların ubikitinasyona uğramamış hallerine göre çok daha düşüktür [27]. Bunun nedeni, birçok ubikitinasyona uğramış proteinin proteozom tarafından hızla parçalanması [28] veya hücre sinyal yollarında dinamik olarak düzenlenmeleridir [29]. İkincisi, ubikitinasyona

uğramış bir protein sadece bir veya birkaç lizin üzerinden modifiye olur [30]. Üçüncüsü, ubiquitin, fosforilasyon ve asetilasyon gibi diğer PTM'lerden daha büyük bir boyuta sahiptir, bu da kütle spektrometresi tarafından doğrudan tespit edilmesindeki zorluğu arttırır. Ayrıca, fosforilasyondan farklı olarak, biyoinformatik olarak bilinmeyen bir proteinin, ubiquitinasyon bölgelerinin doğru bir şekilde tayin edilememesine sebep olan önemli korunmuş motiflere sahip olmadığı görülmektedir [31-33]. Bu nedenle, protein ubiquitinasyon bölgelerini başarılı bir şekilde tanımlamak için, ubiquitinasyon bölgeleri içeren ubiquitinlenmiş proteinlerin veya peptidlerin etkili bir şekilde zenginleştirilmesi için yaklaşımlar gereklidir [1].

Proteinlerin ubiquitinasyon bölgelerinin tanımlanması için geliştirilmiş pek çok yöntem mevcuttur. Ancak, özgün bir hücre sinyal yolunda protein ubiquitinasyonunun dinamik düzenlenmesini incelemek veya bir E3 ligazı veya bir DUB tarafından düzenlenen protein ubiquitinasyon olaylarını tanımlamak için, kütle spektrometresi temelli proteomik yaklaşımlar, proteom düzeyinde ubiquitinasyonun izlenmesine olanak sağlamaktadır.

2.3. Tek Bir Protein İçin Ubikitinasyon Bölgesinin Belirlemesi

Geleneksel olarak, ubiquitinasyona uğramış proteinlerin ve bunlara karşılık gelen modifikasyon bölgelerinin tanımlanması biyokimyasal yaklaşımlarla gerçekleştirilmektedir. Bilinen ilk ubiquitinasyona uğramış protein olan A24 (histon 2A'nın monoubikitinlenmiş formu), fare karaciğerinden bir nükleer protein fraksiyonunun iki boyutlu jel elektroforez üzerinde yürütülmesi ile gözlenmiştir [34]. Bu proteinin ayrıca histon ve ubiquitin içeren dallanmış bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir [34, 35]. Daha sonra, bir proteinin ubiquitinasyona uğramış olup olmadığını belirlemek ve ubiquitinasyon bölgelerini tanımlamak için standart bir yaklaşım geliştirildi. Bu yaklaşımda, varsayılan ubiquitinlenmiş protein immünoçöktürme yöntemi ile saflaştırılmakta ve ubiquitinasyon seviyesi anti-ubikitin Western blotting ile değerlendirilmektedir [36]. Modifikasyon bölgelerini belirlemek için, şüpheli ubiquitinli lizinler, ubiquitinasyona dirençli mutantlar üretmek için arginine dönüştürülmüştür. Etiketlenmiş mutantların ifadesinden sonra, immünoçöktürme yapılarak antiubikitin Western Blot ile analiz edilmiştir. Mutasyon sonrasındaki ubiquitinasyon seviyesindeki azalmaya dayalı sonuçların eldesi ile mutasyona uğramış lizinlerin modifikasyon bölgesini gösterip göstermediği anlaşılmıştır [37-39]. Bu

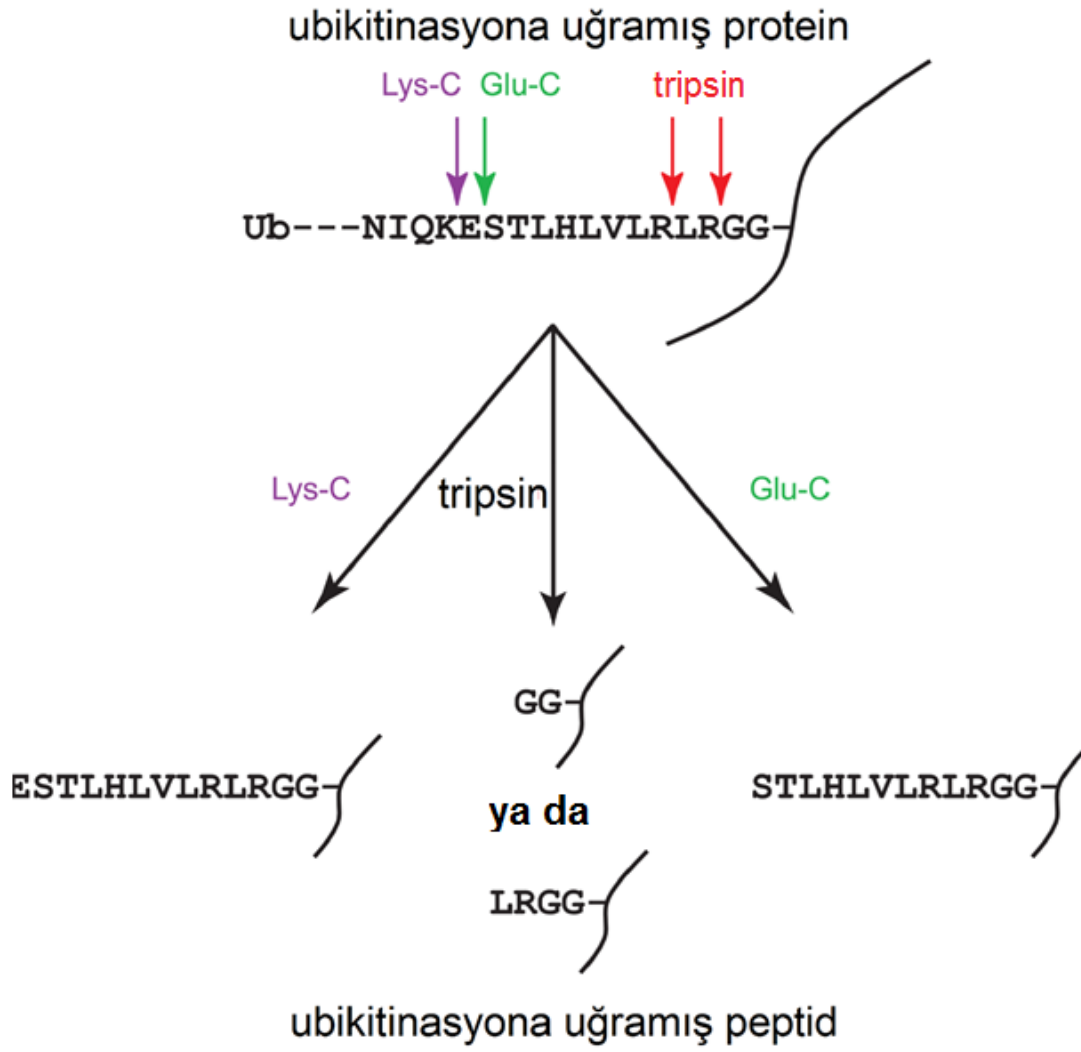
yaklaşım, standart moleküler biyoloji ve biyokimya teknikleri kullanan ve yürütülmesi kolay bir yöntemdir. Bu nedenle, bu yaklaşım proteinlerin ve lizinlerin tek bir protein seviyesinde ubiquitinasyonunun saptanması ve doğrulanması için popüler bir yaklaşımdır. Ancak bu yaklaşımın bazı eksiklikleri vardır. İlk olarak, bu deneyler zahmetli ve zaman alıcıdır. Özellikle de tam modifikasyon bölgelerini belirlemek için birden fazla mutantın üzerinde çalışılması gerektiğinde veya birden fazla bölgenin ubiquitinasyonun yer alması durumunda etkin bir şekilde çalışmamaktadır. [40]. İkincisi, asıl ubiquitinasyon yeri mutasyona uğradığında, diğer yakın lizinler de hedefe alınabilir [39, 41, 42]. Üçüncü olarak, lizinden arginine geçişteki mutasyon protein yapısını bozabilir [43] ve normal ubiquitinasyon yoluna müdahale edebilir. En önemlisi, mutasyondan sonra ubiquitinasyon seviyesinde gözlenen bir azalma, mutasyona uğramış protein ve onun E3 ligazı arasındaki etkileşimin bozulmasına neden olabilir, bu yüzden de E3 ligazı artık mutant yapıyı ubiquitinasyona uğratamaz [44]. Bu nedenle, ubiquitinlenmiş proteinleri ve bunların fizyolojik koşullar altında modifikasyon bölgelerini güvenli bir şekilde tanımlamak için, biyolojik numunelerden doğrudan ubiquitinasyon bölgelerini tespit edebilen kütle spektrometresi temelli yaklaşımlar gibi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanmasında Kütle Spektrometrisi Temelli Proteomik Yaklaşımlar

2.4.1. Ubikitinasyon Bölgelerinin Kütle Spektrometresi İle Tanımlanmasının İlkeleri

Ubikitin bölgeleri, ubikitinden türetilmiş peptid eklentilerinin saptanması yoluyla kütle spektrometresi tarafından tanımlanabilir. Ubikitin C terminali KESTLHLVLRRLRG aminoasit diziliminde bulunan son glisin hedef proteinin lizinine konjuge olabilir. Aminoasitleri modifiye olmadığı sürece, hedef proteinde, konjuge olmuş ubikitinde ya da serbest ubikitinde olduğuna bakılmaksızın, Arg ve Lys' in karboksil uçlarındaki peptid bağları tripsin tarafından kesilir. Konjuge olmuş ubikitin tripsin ile parçalandığında modifikasyona uğramış lizin üzerinde iki tane glisin bırakarak yeni bir tür peptid oluşturur (Şekil 2.2.). Bu peptidler, "ubikitin kalıntısı içeren peptidler" [33] veya "ubikitin imza peptidleri" [45] olarak adlandırılmaktadır. Bu diglisin eklentisinin monoizotopik kütlesi 114.04 Da'dur. Çok nadir durumlarda, tripsin, konjuge olmuş ubikitin üzerinde Arg ve Leusin arasındaki peptid bağı ayırır ancak Arg ve Gly

arasındaki bağı kaçıır. Bu nedenle, monoizotopik kütlesi 383.23 Da olan, dört aminoasitten oluşan LRGG peptidi, substrat üzerinde modifikasyona uğramış bölgede kalır [46, 47]. Lizin üzerindeki bu iki modifikasyon (GG ve LRGG), MS / MS spektrumlarının yorumlanmasını zorlaştıracak karmaşık parçalanma ürünleri üretmezler. Bu sayede, modifikasyon bölgeleri kolayca tayin edilir. Eğer ubiquitinasyona uğramış proteinleri hidrolize etmek için farklı proteazlar kullanılırsa, konjuge ubiquitinden türetilen ve modifiye proteinler üzerinde tutulan peptid fragmentleri daha uzun olabilir. Örneğin, ubiquitinasyona uğramış proteinleri parçalamak için Lys-C veya Glu-C kullanılırsa, modifikasyon bölgelerinde ESTLHLVLR LRGG veya STLHLVLR LRGG dizileri içeren daha uzun peptidler, gözlenir. Özgün peptidler, modifikasyonun ubiquitinden olduğunu kesin olarak belirleyebilir. Kütle spektrometresi tarafından bu özgün kütle farklılıklarının veya lizin üzerindeki özgün peptidlerin saptanması, hem ubiquitinasyon bölgelerinin hem de karşılık gelen ubiquitinli proteinlerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır [1].



Şekil 2.2. Farklı proteazlar ile parçalanan ubikitinasyona uğramış proteinden elde edilen peptidler.

2.4.2. Ubikitinasyon Bölgelerinin MALDI-TOF-MS İle Tanımlanması

Ubikitinasyon bölgeleri, proteinlerin ubikitinasyona uğramış bölgelerinden türetilen modifiye edilmiş peptidlerin tam kütlelerinin ölçümü ile tanımlanabilir. Bu yaklaşımda, ilgili bir protein, bu proteini hedefleyen antikolarla veya FLAG, HA, hekzahistidin (His6) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi bir afinite etiketi ile immüno-çöktürme ile saflaştırılır. Ubikitin molekül ağırlığı 8.5 kDa olduğundan, ubikitinasyona uğramış proteinler modifiye edilmemiş form ile karşılaştırıldığında moleküler ağırlığında bir artışa neden olur ve modifiye proteinlerin tam moleküler ağırlıkları modifiye proteinler üzerindeki ubikitin sayısına bağlıdır. Bu nedenle, proteinin farklı formları jel elektroforez ile ayrılabilir. Ubikitin moleküllerinin ilavesine karşılık gelen düşük hareketlilik bantları ekstrakte edilir ve protein, lizinlerden sonra peptid bağlarını kesen Lys-C ile jel içinde parçalanır. Bir protein ubikitinasyona uğramışsa, ubikitin C-terminalinden gelen aminoasitlerin eklendiği yeni peptidleri ortaya çıkar. Bu peptidlerin tam kütlelerinin MALDI-TOF MS-ile saptanması, ubikitinasyona uğramış peptidleri ve ubikitinasyon bölgelerini tanımlayabilir. Modifikasyona uğramış peptidleri güvenli bir şekilde tanımlayarak yeni peptidleri doğru bir şekilde belirleyebilmek adına, modifiye edilmemiş protein için eş zamanlı bir kontrol deneyi yürütülür. Örneğin, eksojen olarak ifade edilen HA- ve FLAG-etiketli makroH2A1.2, C-terminali üzerinden etiketlenerek saflaştırılmıştır ve proteinlerin ubikitinasyona uğramış bölgelerinden elde edilen yeni peptidler, Lys-C parçalaması sonrası elde edilen ESTLHLVLRLRGG peptidine karşılık gelen kütlelerin eklenmesinin saptanması temelinde tanımlanmıştır. Bu deneyde, macroH2A1.2 üzerinde iki ubikitinasyon bölgesi tespit edilmiştir [48]. Örnek hazırlama için bir proteaz olarak Lys-C' nin kullanılması, yukarıdaki durumda iki avantaj sağlar. Birincisi, makro H2A1.2'deki birçok lizin ve arjininden dolayı, tripsin, saptanması zor olan ve MS ile tanımlanamayan birçok kısa peptid üretir. Birçoğu MALDI-TOF-MS tarafından tespit edilebilir, bu da yüksek aminoasit diziliminin tanımlanması ile sonuçlanır. İkinci avantaj, Lys-C tarafından üretilen ubikitin kalıntısının, özgün bir dizilime sahip uzun bir peptid olmasıdır. İlave kütlelerin belirlenmesi, modifikasyon bölgelerini kesin olarak belirleyebilir. Bu deney için tripsin kullanılırsa, ubikitinasyon bölgelerinin (GG-ε-KR) birinden türetilen peptid, ubikitinasyonun saptanması için çok kısa olacaktır. Bununla birlikte, birçok protein için, tripsinde ubikitinasyon bölgelerinin tanımlanması için

kullanılabilir. Örneğin, GST-etiketli Ubc5'in ubiquitinasyonunun belirlenmesi için bir in-vitro ubiquitinasyon analizi gerçekleştirilmiştir ve GST etiketli ubiquitinasuya uğramış Ubc5' in triptik peptidlerinin tam kütlelerini belirlemek için bir Fourier Dönüşümlü-lyon Siklotron Rezonans Kütle Spektrometresi kullanılmıştır. Ubikitinasyon bölgeleri, modifiye lizinler üzerindeki ek kütlelerin saptanmasıyla tanımlanmıştır [49]. MALDI-TOF-MS, proteinlerin aminoasit dizilimi hakkında herhangi bir bilgi sağlamadığından, ubiquitinasyon bölgeleri hakkında kesin bir sonuç çıkarmak için uygun kontrol ve doğrulama deneyleri gerçekleştirilmelidir. Ubikitinasyon bölgeleri, MALDI-TOF-MS tarafından post-source decay analizi ile kesin olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, sadece normal triptik peptidlerin amino asit dizisini belirlemekle kalmaz, aynı zamanda proteinlerin ubiquitinli kısmından türetilen peptidlerin dizisini de belirleyebilir. Bununla birlikte, post-source decay ile elde edilen MS/MS spektrumları, tipik olarak küçük peptid fragmentleri için zayıftır ve b-iyonlarından gelen sinyaller, amino asit dizisinin tanımlanmasını zorlaştırabilir. Post-source decay analizinden elde edilen MS/MS spektrumlarını basitleştirmek için, Cotter ve arkadaşları [50] ubiquitinasuya uğramış proteinlerin tripsin parçalanmasından elde N-terminallerini ve lizin aminlerini kimyasal olarak modifiye etmek için 4-sülfofenil izotiyosiyanat (SPITC) kullanmıştır. Sülfonasyondan sonra, y-iyonları düşük enerjili çarpışmayla aktive edilmiş ayrışma (Collision activated dissociation, CAD, CID) altında sinyallerini korurken, b-iyonları için sinyaller önemli ölçüde azalmıştır. Bu sebeple, ortaya çıkan MS/MS spektrumları sadece y-iyonları içermektedir ve aminoasit dizisi kolaylıkla belirlenebilmektedir. Ek olarak, MS/MS spektrumları bir dizilim ve bir de imza olmak üzere iki kısım içerir. İmza kısmında, sülfonatlı etiketler N-terminus ve ubiquitinasyon bölgeleri arasındaki amino asit dizisini doğrulayabilen karakteristik kütleler üretir. Bu yaklaşım, MALDI-TOF-MS tarafından ubiquitinasyon bölgelerinin tanımlanmasını kolaylaştırır. Ayrıca, MALDI-TOF-TOF-MS [51] ve ESI-MS/MS [52], iki SPITC parçası içeren sülfonatlı ubiquitin kalıntıları içeren peptidleri doğrulamak için kullanılmıştır. Konjuge peptidlerin tam kütlelerini proteolizden sonra veya MALDI-TOF-MS'de kaynak sonrası bozunmanın ardından tespit etmek her ne kadar ubiquitinasyon bölgelerini tanımlayabilirse de, birçok eksikliğe sahiptir. İlk olarak, modifiye edilmemiş protein ve ubiquitinasuya uğramış protein için oldukça saf örnekler gereklidir. Genel olarak, tek boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE), tripsin parçalamasından sonra peptid verimini azaltabilen kirlilikler içeren bu iki protein

türünü ayırmak için kullanılır. MALDI-TOF-MS analizi, modifikasyon bölgesini içeren modifiye proteinlerden üretilen peptidleri bulmak için iki örnek de eş zamanlı olarak gerçekleştirilmelidir. Ubikitinasyona uğramış bölgeden türetilen peptid, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, deamidasyon ve metionin oksidasyonu gibi başka modifikasyonlar içeriyorsa, bu yaklaşımı kullanarak modifikasyon bölgesini tanımlamak zor olacaktır. Örnek, hazırlama sırasında kirlenmişse veya protein içerisinde birden fazla ubikitinasyon bölgesi mevcutsa, tüm modifiye olmuş peptidleri tanımlamak kolay değildir. Tipik olarak, proteinlerin ubikitlenmiş kısmından türetilen peptidler için MALDI-TOF-MS sinyali düşüktür. Bu nedenle, modifiye edilmiş örneklerden gelen yeni MS piklerinin kapsamlı incelenmesi gereklidir. İlave olarak, bu yaklaşımın verimi çok düşüktür, bu da çoklu ubikitinasyon bölgelerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasını zorlaştırır. Bu eksiklikleri gidermek için Tandem MS' e ihtiyaç vardır.

2.4.3. LC-MS/MS ile Hedef Proteinin Ubikitinasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

LC-MS/MS ile ubikitinasyon bölgelerinin tayin edilebilmesinde ubikitinasyona uğramış türlerin izolasyonu için iki yöntem vardır. Bunlardan oldukça yaygın olarak kullanılanlardan biri, hedef proteinin SDS ile hem ubikitinasyona uğramış hem de modifikasyona uğramamış formlarının izole edilmesidir. Ubikitinasyona uğramış proteine karşılık gelen jel bantları kesilir ve tripsin ile parçalanır. Elde edilen peptidler LC-MS/MS ile analiz edilir ve Mascot, Sequest, X! Tandem, OMSSA, Phenyx, vb. gibi bir hesaplama algoritması kullanılarak bir veritabanı araştırması ile tanımlanır. Proteinlerin modifiye edilmiş kısmından gelen peptidler bile, uygun büyüklükte ve yeterli bolluğa sahip olduklarında da tanımlanabilirler. Bu alandaki ilk örneklerden biri, G protein α alt birimi (Gpa1) için ubikitinasyon bölgelerinin tanımlanmasıdır [53]. Bu deneyde, Gpa1 His6 ile etiketlenmiş veya anti-Gpa1 antikoru kullanılarak saflaştırılmış ve SDS-PAGE'de ubikitinlenmiş protein tripsin ile parçalandıktan sonra CID fragmentasyon modu kullanılarak bir iyon tuzak (Ion Trap) kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Bu proteinin alfa helik sarmal yapısında bir lizin ubikitinasyon bölgesi ortaya çıkarılmıştır. Bu proteinin daha ileri analizleri sonucunda, ubikitinasyona uğraması sayesinde yapısının düzenlediği gösterilmiştir. Ubikitinasyon bölgelerini daha etkili ve açık bir şekilde tanımlamak için, tam denatüre edici koşullar altında ubikitinasyona uğramış proteinleri saflaştırmak için bir bimoleküler afinite saflaştırma yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda, hedef proteinin ubikitinasyona

uğramış formunun saflaştırılmasını kolaylaştırmak için sırasıyla hedef proteine ve ubiquitin N-terminaline özgü iki farklı etiket tasarlanmıştır [54]. Ubikitinasyona uğramış proteinler denature edilip saflaştırılmıştır ve istenilen bölgeden parçalandıktan sonra SDS-PAGE ile ayrılmıştır. Ubikitinasyona uğramış proteinler yukarıda anlatıldığı gibi işlemlerden geçirilerek, LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ubikitinasyon bölgeleri, lizin üzerindeki Gly-Gly modifikasyonunun tespit edilmesiyle belirlenmiştir. Bu yaklaşım, COMMD1, RelA ve HIF-1 α gibi çeşitli proteinler için ubiquitinasyon bölgelerini başarıyla tanımlamıştır [54]. Her ne kadar bu yaklaşımlar birçok protein için ubiquitinasyon bölgeleri tanımlasalar da, bazı dezavantajları vardır. Bu yöntemler düşük verimdedir ve aynı anda çok sayıda protein için ubiquitinasyon bölgelerini tanımlamada kullanılamazlar. Aynı zamanda ifade yapısını oluşturmak için zamana ihtiyaç duyarlar. Ek olarak, bir proteinin çoklu modifikasyon bölgeleri olduğunda ya da poliubikitinasyona uğradığında, ubiquitinli proteinler jel üzerinde bir dalgalanma oluşturur, bu da kesilecek jel bandının boyutunu artırır ve bu nedenle kirliliğe sebep olabilir. Ek olarak, kolayca görülemeyen bazı yüksek molekül ağırlığındaki bantlar gözden kaçırılabilir ve modifiye edilmiş peptidin miktarı gerçek değerinden daha az bulunabilir. Bundan dolayı, ubiquitinasyona uğramış proteinleri ve modifikasyon bölgelerini verimli bir şekilde tanımlamak için alternatif yaklaşımlar gereklidir.

2.5. Proteom Düzeyinde Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanması

Hücrelerdeki ubiquitinasyona uğramış protein sayısının az olması nedeniyle bu proteinleri ve bunların ubiquitinasyon bölgelerini başarıyla tanımlamak için ubiquitinlenmiş proteinleri zenginleştirmek gerekmektedir.

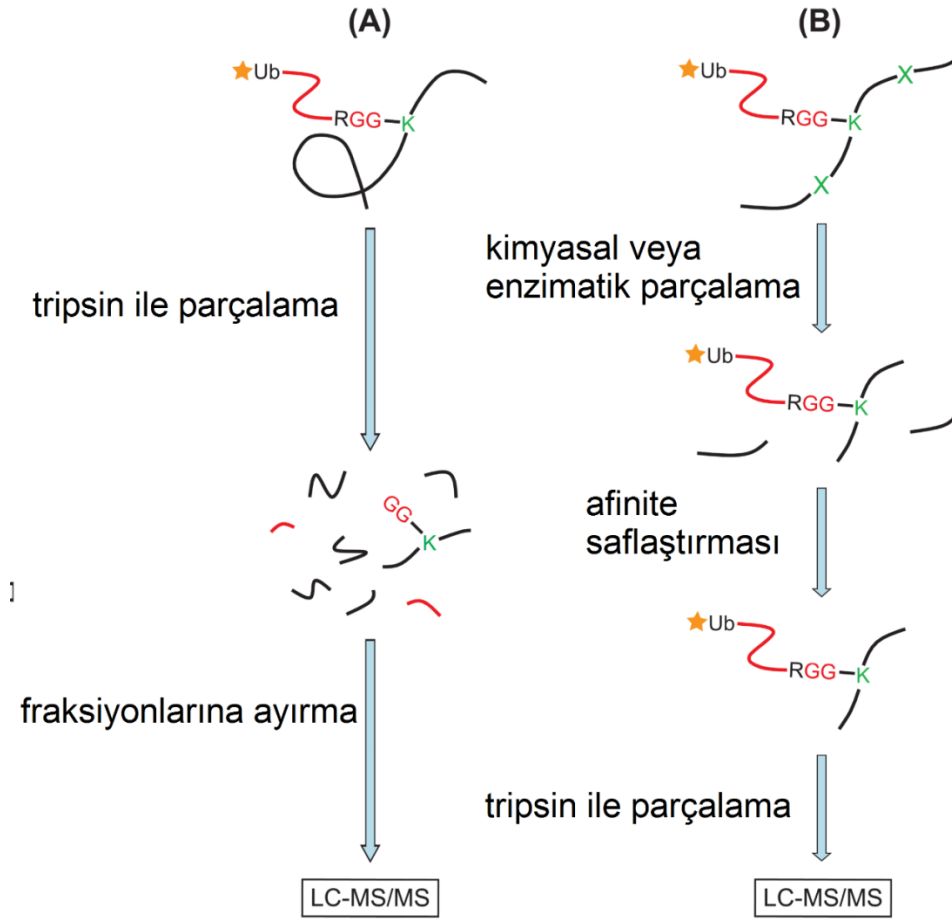
2.5.1. Hücrelerde Ubikitinasyona Uğramış Proteinlerin İzolasyonunda Ubikitin Etiketlenmesi

Ubikitini etiketlemek veya maya ve memeli hücrelerinden ubiquitinasyona uğramış proteinleri izole etmek için birçok küçük afinite etiketi kullanılmıştır (şekil 2.3.) Ubikitinasyon bölgelerinin proteomik tanımlanmasında ubiquitin etiketlemek için kullanılan en yaygın küçük afinite etiketleri His6 [45, 55-58], Biotin alıcı peptid (Biotine acceptor peptide, BAP) [57, 59] ve Strep [31]' dir. Bu kısa peptid etiketleri ubiquitin N-terminalinde üretilir ve etiketli ubiquitin hücrelerde ifade edilir. Bir protein

ubikitinasyona uğradığında, aynı zamanda ubikitin üzerindeki afinite etiketi ile de etiketlenir. Bu nedenle, etiketli ubikitinli proteinler, ticari olarak temin edilebilen reçineler (His6 için Ni-NTA veya TALON, BAP için Streptavidin ve Strep için Strep-Tactin) kullanılarak izole edilebilir ve tandem MS ile tanımlanabilir. Bu alanda gerçekleştirilen çalışmaların ilkinde mayada ubikitin His6 ile etiketlenerek doğal ubikitin yerine etiketli ubikitin ifadesi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde, 72 proteindeki 110 ubikitinasyon bölgesi ubikitinasyona uğramış peptidlerin saflaştırılmasının ardından tripsin ile parçalama gerçekleştirilip peptidlerin fraksiyonlarına ayrılması sonucunda MS/MS ile tanımlanmıştır [45]. Ubikitinasyon bölgesi, modifiye lizin üzerindeki 114.04 Da Gly-Gly katkısının tanımlanmasıyla belirlenmiştir. Ek olarak, triptik peptidlerin tanımlanmasına bağlı olarak, ubikitin kalıntısı içeren peptidler içermeyen, 1000'den fazla protein de tespit edilmiştir. Bu proteinler “varsayılan ubikitinli proteinler” olarak adlandırılmıştır. Bu yaklaşım ayrıca memeli hücrelerinde ubikitinasyona uğramış proteinleri tanımlamak için geliştirilmiştir [55-57]. Bu deneylerde, etiketli ubikitin, endojen ubikitinden çok daha düşük bir seviyede ifade edilmiştir. Bu nedenle, ubikitin etiketlenmesinin protein ubikitinasyon yollarını değiştirmedeği düşünülmektedir [56]. Peptid kütüphanelerinde [60] yapılan bir tarama sırasında keşfedilen kısa bir BAP peptidi (GLNDIFEAQKIEWHE), ubikitinasyona uğramış proteinlerin izole edilmesi için ubikitin N-terminaline eklenmiştir. Lizin aminoasidi, Escherichia coli biyotin haloenzim sintetaz, BirA varlığında, eksojen olarak temin edilen biotin ile etkileşebilmektedir. Bu nedenle, ubikitinasyona uğramış proteinler, MS tanımlanmasından önce biyotin ve streptavidin arasındaki güçlü etkileşim ile önemli ölçüde zenginleştirilebilmiştir. Bu yaklaşım, primer nöronlarda protein ubikitinasyonunu araştırmak için kullanılmıştır [61] ve Drosophila'da önceden bilinmeyen 48 ubikitinli proteinin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. Ubikitinasyona uğramış proteinlerin saflaştırılması için kullanılan bir başka küçük etiket, 8-amino asitten oluşan bir peptide (WSHPQFEK) sahip olan Strep etiketidir ve Strep-Tactin'e güçlü bir şekilde bağlanabilir. Bu bağlanma, düşük konsantrasyonlarda destiyobiyotin veya biyotin içeren elüsyon koşulları altında bozulabilir insan embriyonik böbrek 293T (HEK293T) hücrelerinde Strep-Tactin reçinesi ile ubikitinli proteinleri izole etmek için Strep-HAubikitin kullanan bir proteomik yaklaşım başarıyla geliştirilmiştir [31]. Bu deneyde, bir lineer trap dört kutuplu (LTQ) Orbitrap Velos kütle spektrometresi ile 5756 varsayımsal ubikitinlenmiş substrat arasından 753 ubikitinasyon bölgesi

belirlenmiştir. Bu sonuçlar, afinite ile etiketlenmiş ubiquitin kullanımının yüzlerce ubiquitinasyon bölgesinin tanımlanmasına izin verdiğini göstermektedir. Şekil 1' de gösterildiği üzere ubiquitin, metionin ve sistein içermez. Bu amino asitlerden peptid bağlarını kesen kimyasal yöntemler, proteinlerin ubiquitinasyona uğramış kısmındaki protein fragmentlerini izole edilebilir (şekil 3.). Örneğin, siyanojen bromür (CNBr), metioninlerden sonra peptid bağlarını hidrolize edebilirken, 2-nitro-5-tiyosiyano benzoik asit (NTCB), sisteinlerden peptid bağlarını ayırır. Ubiquitin yapısında bu aminoasitleri içermediği için bu reaktifler ubiquitini parçalayamaz. Bu nedenle, proteinlerin ubiquitinlenmiş kısmının zenginleştirilmesi, substratların kimyasal parçalanmasından sonra ubiquitin N-ucundaki afinite etiketi ile gerçekleştirilebilir. İlave olarak, doğal ubiquitin içindeki tüm lizinler arjinine dönüştürülerek mutasyona uğratıldığında, Lys-C ubiquitini kesemez. Lys içermeyen ubiquitin ile konjuge edilmiş proteinleri ve ubiquitin N-ucundaki afinite etiketini parçalamak için Lys-C'nin kullanılması, proteinlerin ubiquitinasyona uğramayan kısımlarını büyük ölçüde uzaklaştırabilir. Bu ubiquitin içeren fragmentlerin saflaştırılmasından ve tripsin ile parçalanmasından sonra, proteinlerin ubiquitinlenmiş kısmından türetilen peptidler önemli ölçüde zenginleştirilmiştir. Bu da ubiquitinasyon bölgelerinin tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. Bu deney, bir LTQ Orbitrap kütle spektrometresi kullanılarak HEK293T hücrelerinden gelen 794 proteindeki 1392 ubiquitinasyon bölgesinin saptanmasını sağlamıştır [62]. Bu küçük afinite etiketleri, ubiquitinasyon bölgelerinin tanımlanmasını geliştirmiş olsa da, bu yaklaşımların dezavantajları vardır. His-etiketli ubiquitinlenmiş proteini saflaştırmakta, özgün olmayan bağlı proteinleri uzaklaştırmak için denatüre edici koşullar altında Ni-NTA veya TALON reçineleri kullanılır. Fakat, bu reçineler memeli hücrelerinde, ayrıca, birçok histidin bakımından zengin protein ile etkileşirler. 15-amino asitli BAP etiketi durumunda, Bir A'nın hücrelerde eşzamanlı olarak ifade edilmesi gerekir ve kültür ortamına ekzojenli serbest biyotin sağlanmalıdır. Saflaştırma işleminden sonra, biotin ve avidin arasındaki güçlü etkileşime bağlı olarak, küreciklere bağlanan BAP etiketli ubiquitinli proteinler etkili bir şekilde elüe edilemeyebilir. Bu problemin üstesinden gelmek için, çözelti içinde elüsyon ve parçalama yerine kürecikler üzerinde tripsinle parçalama yapılabilir. Ayrıca, endojenli olarak biyotinlenmiş birkaç protein de avidin bazlı reçineler kullanılarak saflaştırılmaktadır. Strep-etiketli ubiquitinli proteinlerin saflaştırılması sırasında, protein-protein etkileşimleri tamamen bozulmayabilir, bu da ubiquitinasyona

uğramamış etkileşim partnerlerinin de izole edilmesine sebep olabilir. Bununla birlikte, yumuşak elüsyon koşulları reçineye özgün olarak bağlanmamış ve etkileşmeyen proteinleri de reçine üstünde tutabilir. Son olarak, tüm bu yaklaşımlarda, ubiquitinasyona uğramış proteinlerle birlikte etiketsiz serbest ubiquitinler de izole edilerek ubiquitinli proteinlerden elde edilen ve az miktarda bulunan peptidleri baskılayabilir. Afinite etiketlerinin seçimi, uygulamaya ve saflaştırma koşullarına bağlıdır. Genel olarak, denatüre edici koşullar altında saflaştırma, protein-protein etkileşimini bozmak ve özgün olmayan bağlı proteinleri uzaklaştırmak için daha iyi çalışır. Ubikitinli proteinlerin afinite saflaştırılmasında ubiquitin etiketlemek için sırayla iki etiketin kullanılması, yukarıda tartışılan bazı sınırlamaların üstesinden gelebilir. Gerçekten de, tam denatüre edici koşullar altında hücrelerden ubiquitinli proteinleri saflaştırmak için His6-BAP-ubikitin kullanan bir yaklaşım geliştirilmiştir [59]. Ek olarak, BAP ubiquitin ve His6-ubikitin'in hücrelerde birlikte ifadeleri ve ubiquitinli proteinlerin His6-etiketi ve BAP içerisindeki biyotin etiketiyle saflaştırılması, çoklu monoubikitinasyona uğramış proteinlerin ve/veya poliubikitinasyona uğramış olan proteinlerin özgün olarak zenginleştirilmesi ve tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır [63].



Şekil 2.3. Etiketlenmiş ubiquitin üzerinden afinite zenginleştirilmesi ile ubiquitinasyon bölgelerinin tayini.

2.5.2. Ubikitinasyona Uğramış Proteinlerin İzole Edilmesinde Anti-Ubikitin Antikorlarının Kullanımı

Etiketli ubiquitin ifadesi, ubiquitinli proteinlerin izolasyonunu kolaylaştırabilir. Bununla birlikte, modifiye edilmemiş hücreler, dokular veya hasta numunelerinden ubiquitinasyon olaylarını belirlemek için bu yaklaşımın uygulanması zordur. Bu nedenle, etiketli ubiquitin kullanılmayan yaklaşımlar daha caziptir. Serbest ubiquitin ve ubiquitin konjugasyonunun saptanması için çeşitli anti-ubikitin antikorları mevcuttur. (I) Tavşan poliklonal antikorları, özgün limpet hemosiyanine (keyhole limpet hemocyanin, KLH) bağlı denatüre konjuge ubiquitine karşı üretilmiştir. Bu antikorlar,

serbest ubiquitine göre konjuge ubiquitin için daha yüksek bir afiniteye sahiptir [64] ve bu nedenle, ubiquitinli proteinlerin immün tayini ve immünoçöktürülmesi için kullanılabilir. (II) P4D1 gibi serbest ubiquitini tanıyan monoklonal antikolar, ubiquitin doğal ubiquitin veya ubiquitin sentetik peptidlerine karşı üretilmiştir. Bu antikolar, Western blot, immün boyama, enzime bağlı immünosorban testi, immünohistokimya, akış sitometrisi ve immünoçöktürme için kullanılabilir. Bununla birlikte, konjuge ubiquitini serbest ubiquitinden ayırt edemez. (III) Ubiquitin konjugatları tanıyan monoklonal antikolar da geliştirilmiştir. FK2 ve FK1, en yaygın kullanılan iki tür antikordur [65]. FK2 antikoru, hem monoubikitinasyona uğramış proteinleri hem de poliubikitinasyona uğramış proteinleri tanıyabilirken, FK1 antikoru sadece poliubikitinasyona uğramış proteinleri tanıyabilir. Ancak ikisi de serbest ubiquitinleri tanıyamamaktadır. FK1 ve FK2 antikoları, immün boyama [65] miktar tayini [66] ve poliubikitinasyona uğramış zincirlerin izolasyonu [67] için kullanılmıştır. IV) K11-, K48-, K63- bağlantıları gibi özgün ubiquitin zincir bağlantılarını tespit edebilen monoklonal antikolar, faj gösterim teknolojisi ile geliştirilmiştir. Bu antikolar, özgün zincir bağlantıları ile poliubikitin zincirlerinin immüno-blot, immün boyama ve immünoçöktürülmesi için kullanılmıştır [68, 69]. Genel olarak, konjuge ubiquitini tanıyan monoklonal antikolar, ubiquitinli proteinlerin izolasyonu için daha uygundur. Yukarıdaki antikoların bazıları, proteomik tanımlama için ubiquitinli proteinlerin izolasyonu için kullanılmaktadır. Örneğin, FK2 antikoru, hastalıklı hücrelerden endojenli ubiquitinasyona uğramış proteinleri izole etmek için kullanılmıştır [70-72]. FK2 antikoları kullanılarak, bir proteazom inhibitörü olan MG132 ile etkileştirilen bir göğüs kanseri hücre yolağında yetmiş varsayımsal ubiquitinli protein ve birçok ubiquitinasyon bölgesi tanımlanmıştır [71]. Benzer bir yaklaşım kullanılarak, akciğer adenokarsinom hücre yolunda 21 ubiquitinasyon bölgesi tespit edilmiştir [72].

Bu yaklaşım, ayrıca, iki boyutlu LC-MS/MS'nin dahil edilmesiyle de geliştirilerek HEK293T hücrelerinde 18 ubiquitinasyon bölgesinin ve 670 farklı varsayılan ubiquitinli proteinin tanımlanmasını sağlamıştır [70]. Bu yaklaşım, genetik manipülasyona ihtiyaç duymadan hayvan dokularından veya hastalardan alınan numunelerde ubiquitinasyonu karakterize etmek için geniş çapta uygulanabilmektedir. Etiketsiz ubiquitinasyona uğramış proteinlerin immünoçöktürülmesinde çeşitli avantajlar ve sınırlamalar vardır. En büyük avantaj, bu yaklaşımın, fizyolojik koşullar altında,

hastalıklı hücrelerden, dokulardan ve hasta örneklerinden gelen endojen proteinlerin ubiquitinasyonunu tanımlayabilmesidir. Bir başka avantaj, ubiquitinasyona uğramış proteinlerin izolasyonu için K11-, K48-, K63- gibi özgün zincir bağlantılı antikörlerin [68, 69] mevcut olmasıdır. Bu deneylerden elde edilen veriler, özgün ubiquitin bağlantısı ile ubiquitinasyona uğramış proteinlerin fonksiyonları hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Bu yaklaşımın birincil dezavantajları, nispeten yüksek antikör maliyetleri ve immünoçöktürölme sırasında geri kazanılan özgün olmayan proteinlerdir.

2.5.3. Ubikitin Bağlanma Bölgeleri Üzerinden Poliubikitinasyona Uğramış Proteinlerin Tanımlanması

Ubikitinasyona uğramış proteinlerin kütle spektrometresi ile tanımlanması için izolasyon işleminin kullanılmasından başka bir yaklaşım ubiquitin bağlanma bölgelerinin (ubiquitin binding domain, UBDs) kullanılmasıdır. Bazı E3 enzimleri, DUB enzimleri ve ubiquitin reseptörleri, ubiquitini tanıyan UBD'leri içerir [73] ve poliubikitinasyona uğramış proteinleri zenginleştirmek için kullanılabilirler. Ubikitin bağlayıcı bölge ve ubiquitin-etkileşimli motif (ubiquitin-interacting motif, UIM) gibi çoklu UBD' ler içeren proteinler, ilk olarak katı bir desteğe kovalent olarak bağlanır. Ubikitinasyona uğramış proteinler daha sonra UBD'ler ve poliubikitin zincirleri arasındaki etkileşim yoluyla izole edilir. Proteazom alt birimi, S5a, iki UIM içerir [74] ve ubiquitinli proteinlerin bozunmasından önce dört veya daha fazla ubiquitin içeren poliubikitin zincirlerine seçici olarak bağlanır [75]. Tan ve arkadaşları poliubikitinasyona uğramış proteinleri elde etmek için S5a kullanmıştır ve karaciğer hücrelerindeki 19 ubiquitinasyon bölgesini tanımlamışlardır [76]. UBD' leri kullanmanın avantajlarından biri, bu yaklaşımın, farklı ubiquitin zincir topolojilerini yüksek afiniteli olarak tanıyan farklı UBD' leri kullanmasıdır. Bu yaklaşımın sınırlandırdığı nokta, mevcut UBD' lerin monoubikitinasyona uğramış proteinlere afinitesinin zayıf olmasıdır, bu da monoubikitinasyona uğramış proteinleri tanımlamak için başka yaklaşımların kullanılmasını gerektirir. Ubikitinasyona uğramış proteinlerin izolasyonu için kullanılan yaklaşımların avantaj ve dezavantajları Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Ubikitinasyon bölgelerinin proteomik tanımlanması için ubikitinasyona uğramış proteinlerin izolasyonunda kullanılan üç farklı yaklaşımın karşılaştırılması.

ETİKETLER	AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
Afinite Etiketli Ubikitin ile Zenginleştirme	• Ubikitin etiketlemek için çok yönlü küçük afinite etiketleri mevcuttur. • Monoubikitinasyon, çoklu monoubikitinasyon, poliubikitinasyon gibi farklı türden ubikitinasyon türleri izole edilemez. • Sert yıkama koşulları kullanılarak özgün olmayan bağlı proteinler azaltabilir.	• Serbest ubikitin de izole edilebilir. • Etiketlenmiş ubikitinin hücrelerde ifadesi gereklidir. • Doku ve hastalardan elde edilen örnekler için uygun değildir.
Anti-Ubikitin Antikorları ile İmmünoçöktürme	• Özgün ubikitin zincir bağlantıları ile ubikitinasyona uğramış proteinleri seçici olarak izole edebilir. • Serbest ubikitinin analiz edimesini engeller. • Genetik manipülasyon olmadan doku ve hastalardan alınan örneklerle uyumludur.	• Yıkama koşulları, özgün olmayan bağlı proteinleri tamamen kaldırmak için yeterli olmayabilir. • Antikordan türetilmiş peptidler izole edilebilir, bu da ubikitinli peptidlerin saptanmasını etkileyebilir. • Oldukça pahalıdır.
Ubikitin Bağlanma Bölgelerinden İzolasyon	• Genetik manipülasyon olmadan doku ve hastalardan alınan örneklerle uyumludur. • Farklı ubikitinasyon bağlanma bölgeleri, özgün ubikitin zincir bağları ile poliubikitinasyona uğramış proteinlerle etkileşime giren afinite proteinleri üretmek için kullanılabilir.	• Monoubikitinasyona ya da çoklu monoubikitinasyona uğramış proteinleri izole edemez. • Yıkama koşulları, özgün olmayan etkileşimlerle bağlanmış proteinleri ortamdaki uzaklaştırmak için uygun olmayabilir. • Deneyden önce saflaştırma işlemleri gereklidir.

2.6. Proteom Düzeyinde Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanması İçin Ubikitin Kalıntılarının Profillenmesi

Ubikitinasyon bölgeleri, ubikitin kalıntısı içeren peptidlerin tanımlanması yoluyla kütle spektrometrik olarak belirlenebilir. Bu proteomik yaklaşımların yaygın bir dezavantajı, MS' de saptanan birçok peptidin, modifiye lizin kalıntıları içermemesidir [31, 55, 70]. Bu durum, bu proteinlerden türetilen peptidlerin, ubikitinle etkileşen, özgün olmayan bağlı proteinler veya gerçek ubikitinasyona uğramış proteinler olup olmadığını belirlemeyi zorlaştırır. Herhangi bir ubikitinasyona uğramış protein için, MS analizinde saptanan peptidlerin çoğunluğu, modifiye lizin kalıntıları içermez, bu da ubikitinasyon bölgelerinin tanımlanmasında kütle spektrometrik analizlerin etkinliğini önemli ölçüde düşürür. Bir proteinin gerçekten ubikitinasyona uğrayıp uğramadığını kesin olarak belirlemek için, modifiye lizin kalıntısı içeren peptidin tanımlanması gereklidir. Ubikitin kalıntılarını içeren peptidlerin zenginleştirilmesi ve saptanması, ubikitin kalıntısı içeren lizinleri bağlayabilen antikorlar ile gerçekleştirilebilir.

2.6.1. Anti-Diglisin Lizin Antikorlarının Geliştirilmesi

2.6.1.1. Ubikitinasyona Uğramış Proteinler İçin Epitop Seçimi

Proteinlerin ubikitinli kısmından türetilen peptidleri tanıyan antikorların üretimi için birçok epitop seçilebilir. Şekil 2'de gösterildiği gibi Glu-C, Lys-C ve tripsin, modifiye lizin üzerindeki konjuge ubikitinden farklı peptidler üretebilirler. Glu-C ve Lys-C, özgün 12 veya 13 amino asit içeren peptid üretirken, tripsin bir diglisin modifikasyonu yaratır veya bazı nadir durumlarda, Leu-Arg-Gly-Gly dizisine sahip bir peptid oluşturur. 12 ve 13 amino asitli peptidler, antikor üretimi için optimal uzunluklara sahiptir. Bununla birlikte, bu iki peptidi hedefleyen antikorlar, büyük olasılıkla serbest ubikitini de tanıyacaktır ve konjuge peptidlere olan özgünlük, onları serbest ubikitinden ayırmak için yeterince yüksek olamayabilecektir. Ek olarak, bu uzun peptidler, iki arjinin ve bir histidin gibi temel amino asitleri içerir. Bunlar, çoklu pozitif yükler oluşturabilir ve triptik peptidlere kovalent olarak bağlandıklarında, kütle spektrometrelerinde elde edilen peptid fragmentlerini karmaşıktırabilirler. Bu durum, tanımlama için yapılan MS/MS spektrumlarının veritabanı araştırmasında teknik zorluklar yaratmaktadır. Diğer yandan, tripsin parçalaması, modifiye lizin kalıntıları üzerinde bir diglisin kalıntısı üretir. Bu modifikasyon nispeten küçüktür,

dolayısıyla bu epitopu hedefleyen antikorların yüksek afinite ve özgünlüğe sahip olamayacağı düşünülmüştür. Fakat, bu antikorun afinitesi ve özgünlüğü, birinci glisinin N-terminalindeki serbest amin mevcudiyeti ve ikinci glisin ve modifiye lizin arasındaki konjugasyona bağlı olarak arttırılabilir. Bu epitopun boyutu ve kimyasal yapısı (Gly-Gly-ε-Lys), allotipik özgünlüğe sahip bir poliklonal antikorun üretilmesi için başarıyla kullanılan bir tetrapeptid olan Gly-Gly-Gly-Gly' ninkine çok benzemektedir [77]. Ayrıca, lizin kalıntısı üzerindeki diglisin modifikasyonu çok kararlıdır ve kütle spektrometresi fragmentasyonu sırasında komplike iyonlar üretmez. Ayrıca, tripsin proteinleri Lys-C veya Glu-C'den daha verimli parçalama yapar. Bu nedenle diglisin kalıntısı, antikor üretimi için cazip bir epitoptur.

2.6.2. Diglisin Modifiye Lizinleri Hedefleyen Monoklonal Antikorların Üretim Stratejileri

Ubikitinasyon profilini çıkarmak için, ubikitin kalıntısına özgün antikorların kullanımını ilk defa Jaffrey Grubu tarafından tanımlanmıştır [33]. Bu araştırmacılar, lizin açısından zengin bir histon proteinindeki tüm lizin kalıntılarını modifiye etmek için t-bütilloksikarbonil (Boc) -Gly-Gly-N-hidroksisüksinimit kullanarak ubikitin kalıntısına özgün antikorlar üretmiştir. Daha sonra Boc koruyucu grubu çıkarmak için trifloroasetik asit kullanmışlardır. Bu Gly-Gly-modifiye histonu, farklı amino asit sekanslarında diglisinle modifiye edilerek lizinleri taklit etmişlerdir ve monoklonal antikorları üretmek için bir antijen olarak kullanılmışlardır [33]. Sonraki bir yayında, Hücre Sinyalleme Teknolojisi Firması tarafından üretilen bir antikor kullanmıştır. Bu antikor benzer bir yaklaşımla üretilmiştir. Bu yaklaşımda, 13 aminoasitten oluşan bir kütüphane oluşturulmuştur. Bu kütüphanedeki N-terminalinde Cys olan diglisin modifiye edilmiş lizin içeren peptidler ortada kalacak şekilde etrafları herhangi 18 aminoasit (Trp ve Cys hariç) tarafından sarılmıştır. Bu peptid kütüphanesi daha sonra KLH taşıyıcı proteine çapraz bağlanmıştır ve tavşanlardan monoklonal anti-diglisil lizin antikoru üretmek için kullanılmıştır [32]. Bu çalışmalar, ilk ubikitin kalıntısına özgü antikorların geliştirilmesini sağlamıştır.

2.6.3. Anti-Diglisin Lizin Antikorlarının Karakterizasyonu

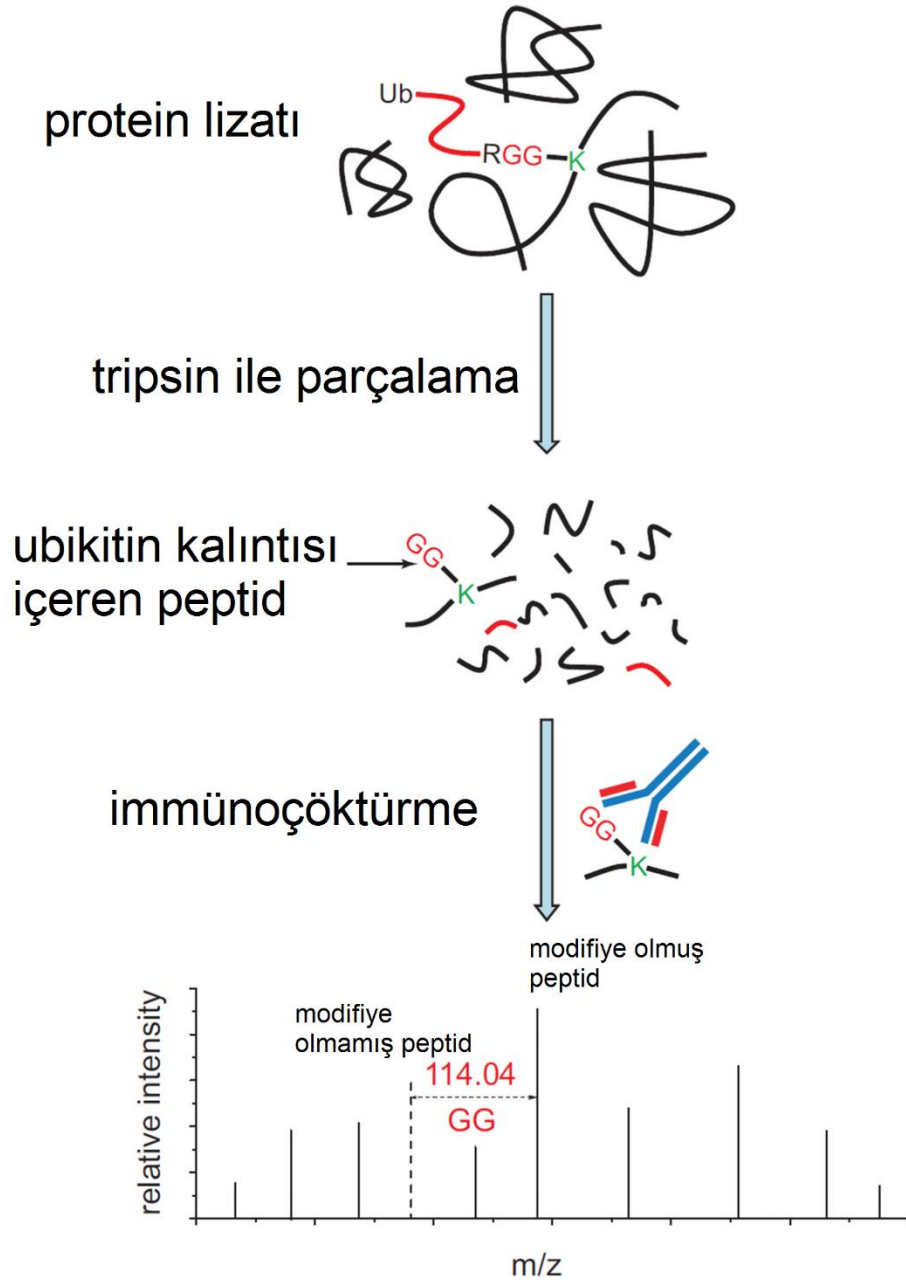
Proteomik uygulamalarda kullanılmaları açısından antikorların özgünlüğü oldukça önemlidir. Genel olarak, 8-20 amino asit uzunluğunda olan peptidler, antikor tanıma

için uygundur. Metil grupları ve diglisin gibi küçük epitopların immünoçöktürme için ihtiyaç duyulan antikorlar için gerekli olan özgünlük ve afiniteyi sağlayamadığı düşünülmüştür. İkinci bir konu, antikorların, farklı dizilerde ubiquitin kalıntısı modifiye edilmiş lizini tanıması gerektiğidir. Anti-diglisil lizin antikorları üretmek için kullanılan stratejilerde, bir antijende birden çok epitop kullanılarak, farklı dizilimlere bağlanabilen antikorlar için seçme olasılığı arttırılmıştır. Bu özelliklerin herbiri antikorların validasyonları yapılırken incelenmiştir. Anti-diglisil lizin antikoru, çeşitli aminoasit dizilerinde diglisinle modifiye edilmiş proteinleri tanıyabilir ve diglisin ile modifiye edilmiş lizinler immünoçöktürme ile ortamdan ayrılabilir. Antidiglisin antikorlarından biri, kompleks karışımlardan ubiquitin kalıntılarını içeren peptidlerin immünoçöktürmesi için kullanılmasından önce kapsamlı olarak karakterize edilmiştir [33]. Bunu yapmak için, antijen I üretmek için kullanılan kimyasal reaksiyonlarla, histon ve fare beyin lizatı dahil olmak üzere diglisin ile modifiye edilmiş lizinler içeren bir dizi protein örneği üretilmiştir. Bu test örneklerini kullanarak, birçok hibridoma hücre hattı arasında en yüksek özgünlüğe sahip bir antikor (klon GX41) tanımlanmıştır. Anti-diglisil lizin Western blot tekniği ile incelenerek, antikorum diglisin ile modifiye edilmiş proteinleri etkili bir şekilde tanıyabildiği ve modifiye olmayan türlerle etkileşmediği doğrulanmıştır. Ek olarak, Western blot üzerinde bir yayma gösteren fare beyin lizatlarının incelenmesi sonucu, bu antikorum protein amino asit dizisinden bağımsız olarak çeşitli dizilişlerde yer alan epitopları tanıyabildiğini gözlemlemiştir. Bu antikorum immünoçöktürmeye yönelik etkinliğini daha fazla teyit etmek için, benzer miktarda modifiye edilmemiş ve diglisin ile modifiye edilmiş peptidleri içeren bir peptid karışımı hazırlanmış ve diglisin ile modifiye edilmiş peptidler, immobilize edilmiş antikor ile çöktürülmüştür. İmmünoçöktürmeden önceki ve sonraki numuneler için yapılan MALDI-TOF-MS analiz sonuçları, immünoçöktürmeden sonra sadece modifiye edilmiş peptidlerin mevcut olduğunu göstermiştir. Ek olarak, bu antikor ayrıca diglisin ile modifiye edilmiş peptidleri, tripsin ile parçalanmış, diglisin ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş sığır serum albümini karışımında çöktürmüştür. Sığır serum albüminden elde edilen diglisin ile modifiye edilmiş iki peptidin MS/MS spektrumları mükemmel b-iyonları ve y-iyonları sağlamış ve modifikasyon bölgelerini kesin olarak tanımlamıştır. Bu sonuçlar, bu antikorum, ubiquitin kalıntılarını içeren peptidleri immün olarak çöktürme kabiliyetini ve MS/MS' nin bu peptidlerin sekansını etkili bir şekilde ortaya koyma kabiliyetini doğrulamıştır.

2.7. Ubikitin Kalıntı Profillemesi ile Yüksek Verimlilikte Ubikitinasyon Bölgelerinin Tayini

2.7.1. Ubikitin Kalıntısı İçeren Peptidlerin Anti-Diglisil Lizin Antikorları ile İmmünoçöktürülmesi

Ubikitin kalıntısı profillemesini gerçekleştirmek için anti-diglisil lizin antikorlarının kullanımını ilk kez ve meslektaşları uygulamıştır [33]. Bu çalışmada proteinler hücre lizatlarından ekstrakte edildikten sonra tripsin ile parçalanmışlardır. Ubikitin kalıntısı içeren peptidler anti-diglisil lizin antikoru ile immünoçöktürülmüştür. Bu peptidlerin tanımlanması, modifiye lizinler üzerindeki 114.04 Da kütle eklentisinin saptanmasıyla sağlanmıştır. Bu strateji, ubikitinasyon bölgelerinin karmaşık protein örneklerinde tanımlanmasını önemli ölçüde arttırabilen “ubikitin kalıntı profili” olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.4). Ardından, bu yaklaşım, birçok grup tarafından kullanılmıştır. Bu çalışmalar memeli hücrelerinde yirmibinden fazla ubikitinasyon bölgesini tanımlamıştır [32, 33, 78-82]. Yürütülen tüm bu çalışmalar, ubikitin kalıntısı profillemenin, ubikitinasyon olaylarının tanımlanması için güçlü bir araç olduğunu ve protein ubikitinasyonunun anlaşılmasını önemli ölçüde geliştirebileceğini göstermiştir.



Şekil 2.4. Proteome analizinde ubikitinasyon bölgelerinin tayini için ubikitin kalıntısı görüntüleme tekniğinin şematik gösterimi.

2.7.2. Ubikitinasyon Bölgelerinin Yanlış Keşif (False-Positive) Tanımlanmasını Azaltmak İçin Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrelerinin Kullanılması

Diğer birçok kimyasal türün 114 Da diglisin modifikasyonuna izobarik olması nedeniyle, ubikitin modifikasyon bölgelerinin tayin edilmesinin çok zor olduğu iyi bilinmektedir. Hidroksiprolil, izolösil, lösil, norlösil, asparajil, ornitil ve aspartil gibi birçok modifikasyon, 2.0 Da pencere kütle doğruluğu çerçevesinde diglisin modifikasyonuna izobariktir. Bunların bir çoğu, bir 2.0 Da civarında kütle doğruluğuna sahip bir iyon-tuzaklı kütle spektrometresi kullanılmazsa, peptid kütlelerinin saptanmasıyla ayırt edilemez. Bu nedenle, düşük kütle doğruluğuna sahip iyon-tuzaklı kütle spektrometreleri kullanılarak daha önceden tanımlanmış ubikitinasyon bölgeleri, daha ileri çalışmalar için dikkatli bir şekilde doğrulanmalıdır. Ubikitinasyon bölgelerinin güvenli bir şekilde tanımlanması için, sırasıyla 10 ppm veya 1 ppm'nin altında bir kütle doğruluğuna sahip Q-TOF veya Orbitrap gibi yüksek çözünürlüklü kütle spektrometreleri gereklidir. Bu cihazlar yanlış keşif oranını önemli ölçüde azaltabilir. Bu aletleri kullanarak, sadece iki izobarik modifikasyonun, asparajin (Asn) ve dikarbamidometil modifikasyonu, sebep oldukları karışıklık tamamen önlenemez.

2.7.3. İzobarik Modifikasyonu Azaltmak İçin Kütle Spektrometresi Veritabanı Araması ve Örnek Hazırlamanın İyileştirilmesi

İki durum, diglisin modifikasyonu ile tam olarak aynı kütlede olan modifikasyonlara neden olabilir. Bunlardan biri, lizine oldukça yakın bulunan Asparajinin (Asn) varlığıdır. Proteomikte veritabanı araştırması genellikle MS/MS spektrumları için çoklu en iyi eşleşmeleri sağlar. Eğer belirlenen ubikitin kalıntısı içeren peptidlerin, modifiye lizine yakın bir Asn içeren dizileri varsa, bu diziler de very tabanına rapor edilecektir ve diglisin modifikasyonları olan peptidleriyle benzer veya daha iyi skorlara sahip olacak sonuçlar alınacaktır. Bu nedenle, bu durum, arama sonuçlarındaki diğer en iyi eşleşmelerin dikkatli bir şekilde incelenmesiyle kolayca tanımlanabilir. Diglisin modifikasyonuna izobarik bir başka modifikasyon, tripsin parçalamasından önce alkilasyon adımı sırasında lizin tortuları üzerinde oluşabilecek dikarbamidometil modifikasyonudur. 37 °C gibi yüksek sıcaklıklarda ve 50 mM gibi yüksek konsantrasyonlarda, yaygın olarak kullanılan alkilleyici reaktif olan iyodoasetamid tarafından lizinlerin iki asetamid grubu yapay olarak modifiye edilebilir. Bu modifikasyon, diglisin modifikasyonu ile aynı kimyasal formüle ve moleküler

ağırlığa sahiptir ve diglisin modifikasyonu olarak yanlış yorumlanabilir [83]. Reaksiyon sıcaklığının 21 °C' ye düşürülmesi ve iodoasetamidin konsantrasyonunun 10-30 mM' a düşürülmesi [44, 80] veya iyodoasetamid yerine daha özgün bir alkilleyici reaktif olan kloroasetamid kullanılması [83] bu yapay modifikasyonu düşük seviyelere indirebilir. Ek olarak, anti-diglisil lizin antikoru, peptid karışımı içinde bu yapay modifikasyonun varlığını önemli ölçüde azaltabilen, dikarbamidometil modifikasyonundan 1000 kat daha fazla ubiquitin kalıntısı içeren peptidi zenginleştirebilir [44, 80]. Bu nedenle, ubiquitin kalıntısı profillemeye, diglisin modifikasyonuna izobarik modifikasyonların girişimini önemli ölçüde azaltabilir. Özetle, ubiquitin kalıntısı profillemeye tekniği, diğer izobarik modifikasyonlardan kaynaklanan yanlış keşif durumlarını önemli ölçüde azaltabilir.

2.8. C-Terminalinden Diglisin İle Modifiye Edilmiş Lizin İle Peptitlerin Tanımlanması

Genel olarak, tripsin, ubiquitin tarafından modifiye edilen lizin sonrası peptid bağlarını kesmez [45]. Bununla birlikte, bazı durumlarda C-terminalinde diglisin modifikasyonu içeren ile peptidler oluşturabilir. Birincisi, bir proteinin C terminalinde bir lizin ile sona ermesi ve bu C-terminal lizin'in ubiquitinasyona uğramış olmasıdır. Gerçekten de, Peng ve arkadaşları, fare beyin lizatında C-terminali diglisin ile modifiye edilmiş üç tane peptid saptamışlardır [80]. İkinci durumda, C-terminalinde çoklu lizin kalıntıları içeren peptidler ubiquitinasyona uğramıştır ve diglisin modifikasyonları, veritabanı arama algoritması ile peptidlerin C-terminaline atanır. Bu durumda, veritabanı arama programı, daha karmaşık MS/MS spektrumları üreten çoklu pozitif yükler mevcut olduğunda, modifiye edilmiş lizini C-terminali amino asitlerine bağlamayı tercih edebilir. MS/MS spektrumlarının manuel olarak incelenmesi, gerçek ubiquitinli lizini doğru şekilde bulmak için gerekli olabilir. Peng ve arkadaşları C-terminali diglisin ile modifiye edilmiş peptidlerin çoğunun bu kategoriye girdiğini bulmuşlardır [80]. Çoklu lizin içeren peptidlerde ubiquitinasyon bölgesini tam olarak belirleyebilmek için oluşturulacak yeni hesaplama algoritmaları, tanımlamayı geliştirebilir. Üçüncü bir olasılık, proteinlerin, hücrelerde aktif proteazlar tarafından lizinden sonra parçalanması ve bu lizinin bu ucunun da ubiquitinasyona uğramasıdır. Bu nedenle, tripsin parçalamasından sonra, c terminalinde diglisin modifikasyonu içeren lizin oluşur.

2.9. Ubikitinasyon Bölgelerinin Tanımlanmasının İyileştirilmesi İçin Proteomik Teknikler

Tripsin, genellikle, ubikitinlenmiş lizinden sonra peptid bağlarını kırmadığı için, ubikitin kalıntısı içeren peptidler normal triptik peptidlerden daha uzundur. Ayrıca, bu peptidler, ubikitin kalıntısındaki glisinin amini üzerinde bulunan fazladan bir pozitif yüke sahiptir. Bu yük, N-terminal amine ve lizin veya arjininin C terminallerindeki aminlerine ilave edilir. Genel olarak, bu peptidler elektrosprey iyonlaşmasında üç veya daha fazla pozitif yük taşıyabilir. Bu nedenle, uzun ubikitin kalıntısı içeren peptidlerin güvenli bir şekilde tanımlanmasında yüksek kaliteli MS/MS spektrumları üretmek için geleneksel CID en iyi parçalanma yöntemi olmayabilir. Bunun yerine, elektron transferli ayrışma çoklu pozitif yükler taşıyan uzun peptidler için daha iyi parçalanma verebilir [84]. +2' den daha fazla yüklü öncül iyonların seçimli fragmentasyonu, daha fazla ubikitinasyona uğramış peptidin belirlenmesini sağlayabilir [82]. Yüksek enerjili çarpışma, yüksek ayırıcılık ve yüksek kütle doğruluğu ile peptid fragmentleri oluşturur, bu da veritabanı araştırması sırasında netlik sağlar. Bu üç peptid fragmentasyon yöntemi tamamlayıcıdır [85] ve bunların eşzamanlı kullanımı daha fazla ubikitinasyona uğramış peptidin tanımlanmasıyla sonuçlanabilir. Protein veri tabanları sınırlı sayıdaki doğal protein varyantları içerir. Bununla birlikte, birçok ubikitinasyona uğramış protein düzgün bir şekilde katlanamaz. Bu proteinler, ubikitinasyona uğrayıp, proteazom tarafından parçalanırlar. Eşleşmeyen MS/MS spektrumlarının de novo dizilimi yapılarak, gerçek amino asit dizisi veritabanlarında bulunmayan ubikitinasyon olaylarının belirlenmesi sağlanabilir.

2.10. Ubikitin Kalıntısı Profillemeye Yaklaşımının Kısıtlaması

İki ubikitin benzeri modifiye edici, NEDD8 ve ISG15, C terminallerinde Arg-Gly-Gly dizilimine sahiptir hedef proteinlerdeki lizine konjuge olabilirler. Bu modifiye edici proteinlerin tripsin ile parçalanmasından sonra elde edilen peptidler ubikitin kalıntısı içeren peptidlerden ayırt edilemez. Bununla birlikte, hücrelerdeki ISG15 ve NEDD8 üzerinden gerçekleşen modifikasyonlar, az sayıda özgün protein alt kümeleriyle sınırlı gibi görünmektedir. Örneğin, ISG15 ifadesi tip I interferon tarafından tetiklenir ve ISG15 miktarı normal hücre kültürü koşulları altında çok düşüktür [86]. NEDD8' in diğer proteinleri kovalent olarak modifiye edebileceği biliniyor olmasına rağmen, esas

olarak cullin ailesi proteinlerini modifiye eder [87-89]. Bu nedenle, bu ubikitin benzeri modifikasyonlar sadece diglisin ile modifiye edilmiş peptidlerin çok küçük bir yüzdesini oluşturur [32, 44]. Alternatif olarak, tripsin parçalanması öncesi ubikitinli proteinleri izole eden bir zenginleştirmenin gerçekleştirilmesi bu sorunu çözebilir [33]. Bunu yapmak için, ubikitinli proteinlerin izolasyonu için daha önce bahsedilen yaklaşımlardan biri uygulanabilir.

2.11. Ubikitin Kalıntısı Profillemeye Tekniğinin Uygulamaları

Ubikitin kalıntısı profillemeye tekniği, ubikitinasyon işlemlerinin yüksek verimli bir şekilde tanımlanmasının etkinliğini önemli ölçüde artırabilir. Başlangıcından bu güne, bu yaklaşım, sinyal yollarında meydana gelen veya ubikitin proteazom sistemine (UPS) katılan belirli düzenleyici enzimlerle düzenlenen ubikitinasyon işlemlerini profilemek için kullanılmıştır. Bu yaklaşımdan ortaya çıkan veriler, ubikitinasyonun fosforilizasyondan sonra en yüksek oranda rapor edilmiş post-translasyonel modifikasyon olduğunu göstermektedir [82].

2.12. Protein Ubikitinasyonunun Farklı Düzenleyici Fonksiyonlarının Keşfi

Protein ubikitinasyonunun hücresel süreçlerin hemen hemen her alanında rol oynadığı iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, hangi ubikitinasyon işlemlerinin hücre sinyalizasyonunda düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğunu hızlıca ayırt etmek için yüksek verimli bir yaklaşım yoktur. Wagner ve arkadaşları ile Kim ve arkadaşları, ubikitin kalıntısı profillemeye yaklaşımını kullanarak insan hücrelerinde protein ubikitinasyonu üzerine çalışmışlardır ve 20.000' den fazla ubikitinasyon bölgesi tanımlamışlardır [32, 82]. Bu veri setlerinde, ubikitinasyon bölgelerinin neredeyse yarısı, parçalayıcı olmayan fonksiyonlara sahiptir ve proteazom inhibisyonu sonrası birçok bölgenin ubikitinasyon seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, çok sayıda proteinin, çok sayıda lizin üzerinden ubikitinasyona uğradığı ve bir protein içindeki her bir lizin modifikasyonunun birbirinden bağımsız olarak ayrı ayrı düzenlendiği görülmüştür [33]. Bu sonuçlar, aynı protein içindeki farklı ubikitinasyon bölgelerinin tamamen farklı fonksiyonlara sahip olabileceğini düşündürmektedir. Gen Ontoloji (GO) açıklamasını kullanarak Wagner ve arkadaşları ubikitinlenmiş proteinlerin, hücre sinyalleri, reseptör endositozu, DNA replikasyonu, DNA hasar onarımı ve hücre döngüsü ilerlemesi gibi çeşitli hücresel fonksiyonlara sahip olduğunu doğrulamıştır

[82]. Hücre yüzey proteinlerinin ubiquitinasyonunun belirlenmesi, hücre sinyal yollarının incelenmesi açısından kritik öneme sahiptir [90]. Wagner ve arkadaşları, Wnt, Notch ve G-protein bağlı reseptör sinyalleme gibi çeşitli sinyalleme yollarında yer alan birçok hücre yüzey reseptörünün ubiquitinasyonunu keşfetmişlerdir. Ubikitinasyon, hücre yüzey reseptörlerinin aşağı regülatörleri olan birçok sitoplazmik tirozin ve serin treonin kinazlarında da tespit edilmiştir. Bu deneylerin dışında dikkat çeken başka bir bulgu, ubiquitinasyon işlemlerinin çoğunun yeni sentezlenmiş proteinler üzerinde gerçekleşmesidir [32]. Bu ubiquitinasyon olayları, düzgün bir şekilde katlanamayan yeni proteinlerin yok edilmesine hizmet eder. Ortaya çıkan yanlış katlanmış proteinler, ubiquitinasyona uğrar ve ubiquitin proteazom sistemi üzerinden parçalanır.

2.13. Özgün E3 Ligazları Tarafından Düzenlenmiş Ubikitinasyon İşlemlerini Profilleme

Ubikitinasyon alanındaki en önemli noktalardan biri, özgün E3 ligazları için substratları tanımlamaktır. Bu amaçla birçok strateji geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesinde, ubiquitin moleküllerinin in vitro ortamda bir E3 ligaz varlığında sabitlenmiş substratlara konjugasyonundan sonra ubiquitin sinyalini tespit etmek için protein mikrodarray teknolojisinin kullanılmasıdır [91-94]. İkinci bir strateji, özgün bir E3 ligazının varsayılan substratlarını tanımlamak için hücrelerdeki özgün bir E3 ligaz aktivitesinin değişmesinden sonra protein stabilitesinin değişiminin ölçülmesine dayanır [95-97]. Üçüncü bir strateji ise, E3 ligazlarının ifadesindeki değişimden sonra ubiquitinasyona uğramış proteinleri etiketleyerek izole edip, kantitatif proteomiks çalışmaları ile göreceli bulunma miktarlarını hesaplamaktır [98]. Bununla birlikte, bu yaklaşımların hiçbirisi, E3 ligaz aktivitesinin in vivo indirgenmesi üzerine, ubiquitinasyon bölgeleri için ubiquitinasyon seviyelerinin değişimini doğrudan ölçmemektedir. Ubikitin kalıntısı profilleme tekniği, E3 ligazlarının substratlarını doğrudan belirleyebilir. Bir E3 ligazının özgün hedeflerini belirleyebilen ve potansiyel bir terapötik hedef olup olmayacağını değerlendirebilen özgün bir E3 ligazına yönelik substratları tanımlamak oldukça önemlidir. Kantitatif proteomik çalışması gerçekleştiren Lee ve arkadaşları [79], romatizma ve diğer hastalıklarla bağlantılı bir RING bölgesi içeren E3 ligaz olan HRD1 (synoviolin) için yüzlerce substrat ve bunların ubiquitinasyon bölgelerini tanımlamıştır.

2.14. Ubikitin Kalıntısı Görüntüleme Yaklaşımının Gelecekteki Uygulamaları

2.14.1. Belirli Ubikitin Zinciri Bağlantısıyla Ubikitinasyon İşlemlerinin Belirlenmesi

Protein ubikitinasyonunun fonksiyonel özellikleri, ubikitinasyon türü ve özgün poliubikitin zincir bağlantısı ile yakından ilişkilidir [99]. Bu nedenle, farklı ubikitin zincir bağları ile modifiye edilen ubikitinasyon olaylarının belirlenmesi ve hücre sinyal yollarındaki dinamik regülasyonlarının anlaşılması çok önemlidir. Ubikitin bağlanma bölgeleri veya özgün bağlantı antikorları tarafından farklı zincir bağlantıları içeren ubikitinasyona uğramış proteinlerin izole edilmesi için yeni teknikler geliştirilmesi sonucu, farklı ubikitin zincir bağlantıları içeren ubikitinasyon olaylarının ubikitin kalıntısı profillemeye yöntemi ile aydınlatılabileceği beklenmektedir.

2.14.2. Hücre Sinyal Yollarıyla Oluşan Ubikitinasyon İşlemlerinin Tayini

Birçok ubikitinasyon işlemi, hücre sinyal yollarının aktivasyonu ile tetiklenir. Ubikitinasyon bölgeleri hakkında herhangi bir bilgi olmaksızın ubikitinlenmiş proteinleri belirleyen bir proteomik deney, EGF sinyalleme altında ubikitin ağını incelemek için gerçekleştirilmiştir [100]. Bir sinyalleme molekülünün varlığında veya yokluğunda ubikitin kalıntısı profillemesi gerçekleştirilerek, sinyalleşme sırasında ortaya çıkan ubikitinasyon işlemleri kolaylıkla tanımlanabilir. Aslında, birçok hücre yüzeyi sinyal proteinlerinin, ubikitin kalıntısı profillemesi ile ubikitinasyona uğradığı tespit edilmiştir [82].

2.14.3. Ubikitin Proteazom Sistemindeki Etkileşim Ağının Aydınlatılması

İnsan genomunun biyoinformatik analizleri, hücresel ubikitinasyon yollarını etkilediği görülen yüzlerce ubikitin düzenleyici enzimi keşfetmiştir. Bir E1 enzimi, ubikitini aktive edip onlarca E2 enzime aktarabilir ve her bir E2 enzimi, hedef ubikitinasyona aracılık etmek üzere çok sayıda E3 ligazı ile farklı protein-protein etkileşim kompleksleri oluşturabilir. Her bir E3 ligazı, birçok protein substratı ile etkileşime girebilir onları ubikitinasyona uğratabilir. Üstelik, bir protein birkaç E3 ligazı tarafından ubikitinasyona uğramış olabilir ve her an deubikitine edici enzimler tarafından ubikitinasyon bozulabilir. Bu nedenle, bu enzimler ve bunların substratları karmaşık ve dinamik olarak düzenlenen bir etkileşim ağı oluşturur. Özgün E3 ligazları için ubikitinasyona uğramış proteinlerin ve bunların ubikitinasyon bölgelerinin

tanımlanması, bir ubikitinasyon olayının çoklu E3 ligazları tarafından düzenlenip düzenlenmediğini ve bunların biyolojik fonksiyonlarının yanısıra hastalık ilerlemesi ve ilaç gelişimindeki rollerini anlamaya yardımcı olacaktır. Ubikitin kalıntısı profillemeye tekniği, bu işlemleri yüksek verimli bir şekilde tanımlayabilir ve ubikitin proteazom sistemindeki karmaşık etkileşim ağını deşifre edebilir. Bu bilgi, hangi özgün E3 ligazının potansiyel bir ilaç hedefi olabileceğini veya çoklu E3 ligazlarının hedeflenmesinin hastalık tedavisine fayda sağlayıp sağlayamayacağını değerlendirilmesine yardımcı olabilir [1].



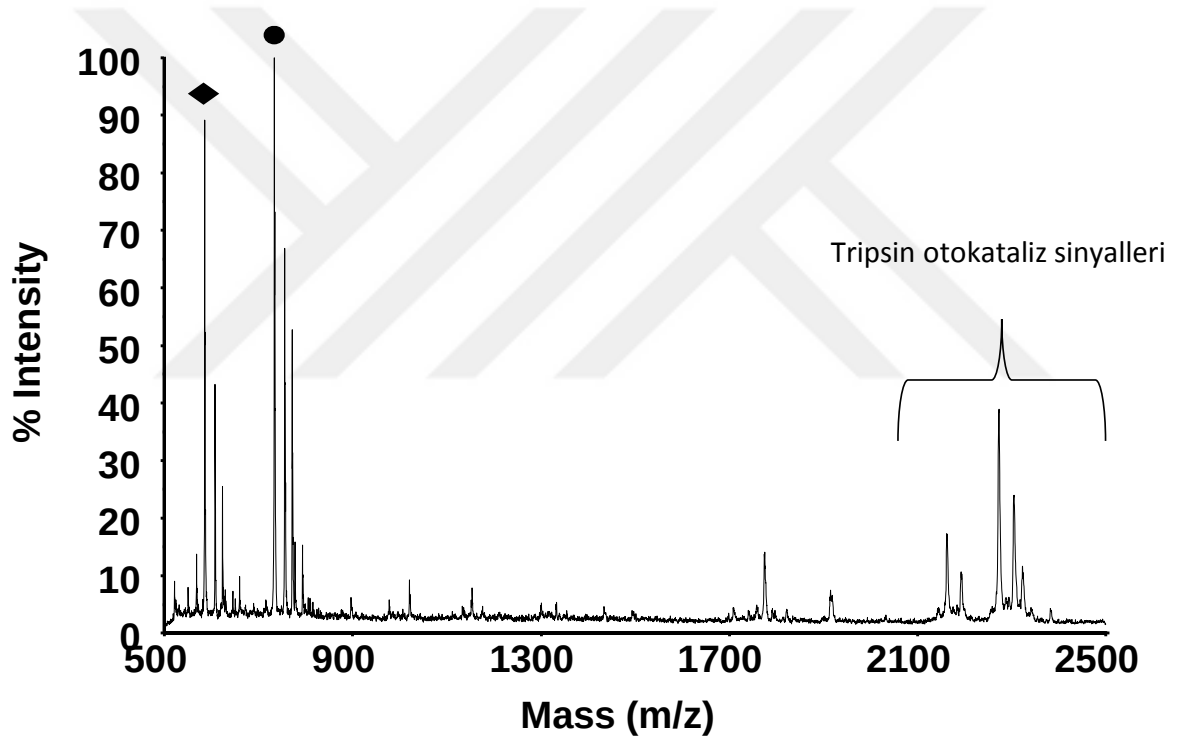
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Bölüm 1: Protein Ubikitinasyonunun Referans Biyomoleküller Üzerinde Kütle Spektrometrik Olarak İncelenmesi

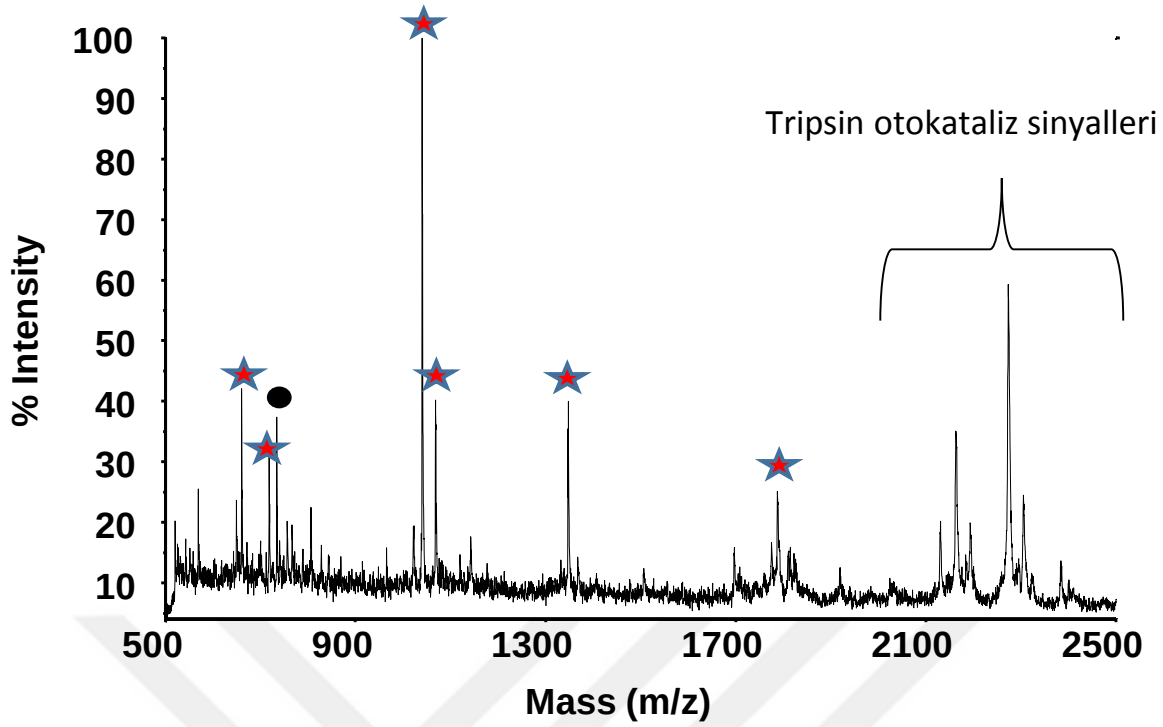
Proteinlerin; fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon ve ubikitinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları birçok hücresel işlevin ve hücre içi sinyal olaylarının düzenlenmesine olanak sağlamaktadır. Ubikitinasyon; birçok protein grubunun düzenlenmesi ve bozunmasında anahtar rol oynayan, çok fazla rastlanan bir post-translasyonel modifikasyondur. Proteomiks alanında ubikitinasyon ve poliubikitinasyon analizi, en aktif çalışma alanlarından biri olarak öne çıkmaktadır. Kanseri, metabolik sendromlar, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Huntington), inflamatuvar bozukluklar, otoimmünite (kendi dokularındaki antijenlere karşı antikor oluşması), enfeksiyon ve kas erimesi gibi hastalıkların başlangıç ve ilerlemelerinde ubikitinasyon aktif olarak rol almaktadır. Ubikitinasyona uğramış protein fonksiyonlarının aydınlatılarak bu tür hastalıklar için teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için bu proteinlerin tanımlanması, ubikitinasyon bölgelerinin tespit edilmesi ve bağlanma mekanizmalarının aydınlatılması son derece önemlidir. Proteomiks araştırmalarının bu alanında yani modifikasyon bölgelerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılabilecek, en hassas ve güvenilir sonuçların elde edilebileceği cihazlar, diğer analitik tekniklere kıyasla üstün özelliklere ve ileri teknolojiye sahip kütle spektrometrik cihazlardır. Bu çalışmanın amacı, yüksek kütle ayırıcılığa ve doğruluğuna sahip kütle spektrometrik cihazlar kullanarak düşük miktarlarda bulunan ubikitinasyona uğramış proteinlerin modifikasyon bölgelerini tayin etmektir. Bu kapsamda yapılması planlanan çalışmalar kapsamında öncelikle Histon 2B peptid ve ubikitinasyona uğramış Histon 2B baz alınarak araştırma laboratuvarımızda bulunan matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaşmalı uçuş zamanlı kütle spektrometresi kullanılarak çeşitli örnek hazırlama ve cihaz analiz parametreleri optimize edilerek çalışmayla ilgili temel analizler gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında Histon 2B peptidi ve monoubikitinasyona uğramış histon 2B peptidi temin edilmiş ve bu biyomoleküller tripsin enzimi kullanarak parçalanmaya

uğrattıldıktan sonra elde edilen parçalanma ürünlerinin analizleri MALDI-TOF-MS ile gerçekleştirilmiştir. Histon 2B peptidi ve monoubikitinasyona uğramış histon 2B peptidi parçalanma ürünlerinin analizleri gerçekleştirildikten sonra elde edilen spektrumlar izlenerek her birinin analizi için en uygun şartlar belirlenmiştir. Elde edilen spektrumlar birbirleri ile karşılaştırılmış ve aralarındaki farklılıklar belirlenmiştir. Monoubikitin modifikasyonuna uğratılmış Histon 2B (1.0 mg/mL) ve Histon 2B (2.0 mg/mL) protein örnekleri hazırlanmıştır. Enzimatik parçalamada kullanılan tripsin enzimi (1.0 mg/mL) 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde ayrıca hazırlanmıştır. Her iki protein de tripsin enzimi çözeltisi ile birlikte 1:5 (enzim/protein) hacim oranında karıştırılmış ve karışımlar, 12 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir. Çözeltiler analiz öncesinde +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır.



Şekil 3.1. Histon 2B peptidinin enzimatik parçalama sonrası pozitif iyon ve lineer modda MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi. ◆Histon 2B YTSSK peptidine ait sinyal ve ●Histon 2B AVSEGTK peptidine ait sinyal.



Şekil 3.2. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalama sonrası pozitif iyon ve lineer modda MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi.

★ Ubikitine ait peptit sinyallerini göstermektedir ve ● Histon 2B AVSEGK peptidine ait sinyal.

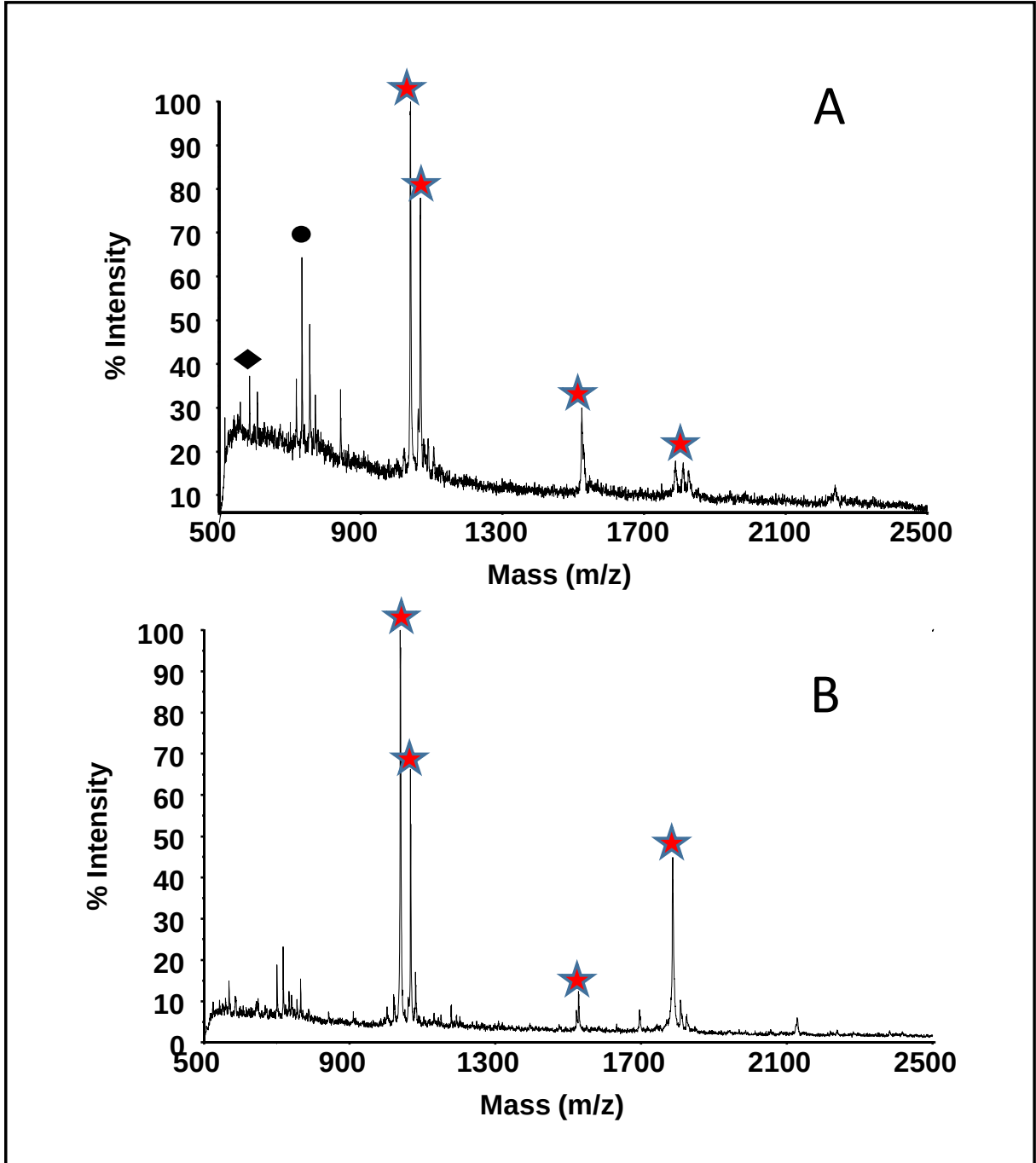
Referans alınan Histon 2B aminoasit dizilimi Ac-AVSEGTKAVTKYTSSK-NH₂ şeklindedir. Bu peptit tripsin enzimi aracılığı ile enzimatik parçalamaya uğratıldıktan sonra YTSSK peptidine ve AVSEGK peptidine ait sinyallerin gözlenmesi beklenmektedir (Ac-AVSEGTKAVTKYTSSK-NH₂). Bu sinyallere ait monoizotopik kütleler sırasıyla 585.2879 Da ve 733.3727 Da olup, şekil 3.1' de görülmektedir. Tripsin enzimi bazik aminoasitler olan arjinin ve lizine pozitif yan zincirleri olan amin gruplarından yaklaşılarak bu aminoasitlerin C terminallerinden parçalamasını sağlar. Referans alınan monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidine ait aminoasit dizilimi Ac-AVSEGTKAVTK(ubikitin)YTSSK-NH₂ şeklindedir. Bu peptit tripsin enzimi aracılığı ile enzimatik parçalamaya uğratıldığında YTSSK peptidine ait sinyal gözlenmemektedir (Şekil 3.2). Bunun sebebi, ubikitin sonundaki glisin lizinin yan zincirindeki NH₂ grubuna bağlanmasıyla o bölgeyi tripsin enziminin yaklaşamayacağı şekilde bloke etmesi ve lizinin C terminalindeki peptid bağından gerçekleşecek triptik parçalanmanın engellenmesidir. Histon 2B peptidindeki ubikitinasyona uğramamış

AVSEGTK' daki lizinin C terminalindeki peptid bağından ise tripsin ile parçalama gerçekleşeceğinden parçalama sonrası elde edilmesi beklenen bu peptide ait sinyal gözlenmeye devam etmektedir (Şekil 3.2). Yapılan analizler sonucunda referans biyomoleküllere ait spektrumlardaki peptit sinyallerinin yorumlanması ile ubiquitinasyon postranslasyonel modifikasyonun kütle spektrometrik olarak izlenmesinin mümkün olduğu tespit edilmiştir.

3.1.1. Referans Peptit Üzerinde Sıcaklığın Özgün Olmayan Ubikitinasyon Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi

Enzimatik reaksiyonlar sonucunda belli bir lizin üzerinden monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin, Ac-AVSEGTKAVTK(ubikitin)YTSSK-NH₂, parçalanma ürünlerine bakıldığında, ubiquitinasyona uğramamış bölgesindeki lizinin C terminalden tripsin enzimi tarafından gerçekleştirilen parçalanma sonucu elde edilen peptide ait monoizotopik kütle 733.3727 Da olduğu görülmektedir. Ubikitinasyona uğramış lizinin C terminalinden bir parçalanma gerçekleşemeyeceğinden, YTSSK dizilimine ait 585.2879 kütleli sinyal enzimatik parçalama sonrasında görülmemektedir. Histon 2B peptidinin ubikitin proteini ile ubiquitinasyon mekanizmasında rol alan enzimlerin bulunmadığı bir ortamda inkübe edilmesi sonrasında gerçekleştirilen enzimatik parçalama sonucunda hem YTSSK dizilimine ait 585. 2879 kütleli hem de AVSEGTK dizilimine ait 733.3727 kütleli sinyaller görülmektedir. (Şekil 3.3. A). Çünkü ortamda ubiquitinasyonu sağlayıcı E1, E2 ve E3 enzimlerinin bulunmaması nedeniyle peptit üzerindeki herhangi bir lizin üzerinde ubiquitinasyon gerçekleşmesi beklenmez ve bu durumdan dolayı tripsin enzimi Histon 2B peptidi üzerindeki lizinlerin bazik yan zincirlerinden yaklaşılarak C terminalindeki peptid bağından parçalama yapar. Ancak sıcaklık arttırıldığında, inkübasyon sonrasında gerçekleştirilen enzimatik parçalama ile elde edilen spektrumda yukarıda bahsedilen her iki peptide ait sinyallere rastlanmamaktadır. Bu durum sıcaklık etkisiyle gerçekleşmiş olabilecek özgün olmayan ubikitin bağlanmalarını işaret etmektedir. Ubikitin Ac-AVSEGTKAVTKYTSSK-NH₂ peptidi üzerindeki işaretli lizinelere özgün olmayan bir etkileşimle bağlanmış ve bu aminoasitlerin yan zincirindeki amin gruplarını bloke ederek tripsin ile peptid bağının parçalanmasını engellemiştir (Şekil 3.3. B).

Bu bölümde gerçekleştirilen çalışmalar standart peptitler üzerinden yürütülmüştür. Böylelikle, ortamda protein ubiquitinasyonunun kütle spektrometrik olarak izlenmesi kolaylaştırılmıştır. Ancak, hücre gibi daha kompleks bir örnek üzerinde bu modifikasyona uğramış az sayıda proteini belirlemek ve modifikasyon bölgelerini belirleyecek analizleri gerçekleştirmek oldukça zordur. Çünkü hücre ortamında ubiquitinasyona uğramamış çok sayıda proteinden tripsin parçalaması sonrası elde edilen diğer peptitler bu modifikasyona uğramış peptitleri baskılayacaktır. Bu nedenle, bu modifikasyonun ve modifikasyon bölgelerinin başarılı bir şekilde tayinlerini yapabilmek için yürütülecek çalışmalarda ubiquitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesi şarttır. Ayrıca bu tür karmaşık karışımların sıvı kromatografisi (LC) ile ayrılıp sonrasında kütle spektrometrik analizlerinin yapılmasıyla daha yüksek hassasiyette tayinlerin gerçekleştirilmesine olanak sağlanacaktır. Dolayısıyla, nano-LC sistemler ile birleştirilmiş yüksek ayırma gücüne sahip kütle spektrometrik cihazlarda, hücre örneğinden zenginleştirme sonrası elde edilen ubiquitinasyona uğramış peptitlerin analizlerinin gerçekleştirilmesi planlanmıştır.



Şekil 3.3. (A) 2 mg/mL Histon 2B - 0.13 mg/mL Ubikitin 1:1 (v/v) karışımına ait pozitif iyon ve lineer modda elde edilen MALDI-Kütle spektrumu. (B) 60 °C' de ikübe edilen 2 mg/mL Histon 2B - 0.13 mg/mL ubikitin 1:1 (v/v) karışımının pozitif iyon ve lineer modda elde edilen MALDI-Kütle spektrumu. ♦ Histon 2B YTSSK peptidine ait sinyal, ● Histon 2B AVSEGK peptidine ait sinyal ve ★ ubikitine ait peptit sinyallerini göstermektedir.

3.2. Bölüm 2: Kütle Spektrometrik Yöntemlerle Kanser Hücrelerinde Ubikitin Protein Ligazlarının Rollerinin Aydınlatılması

Tezin ikinci bölümünde geçen çalışmalar bir yıl süresince ziyaretçi araştırmacı olarak gittiğim Karolinska Enstitüsü' nde Roman A. Zubarev' in araştırma grubunda gerçekleştirilmiştir.

MCP MOLECULAR & CELLULAR
PROTEOMICS

QUICK SEARCH Author: Keyword: Year: Vol: Page: **Go** [Advanced Search]

[Home](#) [Current issue](#) [Papers in Press](#) [Archive](#) [Reviews](#) [Editorials](#) [Special Issues](#)

▼

Comparative proteomics of dying and surviving cancer cells improves the identification of drug targets and sheds light on cell life/death decisions

Amir Ata Saei¹, Pierre Sabatier¹, Ülkü Güler Tokat¹, Alexey Chernobrovkin², Mohammad Pirmoradian² and Roman A. Zubarev^{1,*}

+ Author Affiliations

* Corresponding Author:
Roman A. Zubarev, Karolinska Institute, Stockholm, 171 77, Sweden. E-mail: roman.zubarev@ki.se

Dibavar A. S., Sabatier P., Güler Tokat Ü., Chernobrovkin A., Pirmoradian M., and Zubarev R.A., Comparative proteomics of dying and surviving cancer cells improves the identification of drug targets and sheds light on cell life/death decisions, *Molecular and Cellular Proteomics*, 2018.

3.2.1. Ubikitinasyon Veri Analizi

Kanser proteomiksi alanında çeşitli antikanser ilaçları 5-fluorouracil (5FU), methotrexate (MTX) ve paclitaxel (PCTL)) ile muamele edilmiş kolon kanseri (HCT119, RKO) ve deri kanseri (A 375) hücreleri üzerinde gerçekleştirilen kütle spektrometrik çalışmalar sonucunda alınan ham veriler ubikitinasyona uğramış proteinleri ve peptitleri tanımlayabilmek için değerlendirilmiştir. Kütle spektrumları Orbitrap Q Exactive Plus Kütle Spektrometresi (Thermo Fisher Scientific) ile elde edilmiştir. Kütle Spektrometresi ile elde edilen ham veriler Max Quant 1.5.3.8 versiyonu ile analiz edilerek hem canlı hücrelerde (yüzeye tutunmuş) hem de ölü hücrelerde (yüzeyden ayrılmış) ubikitinasyona uğramış peptit ve proteinler tayin edilmiştir. En sonunda veri analizleri Microsoft Excel ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Ubikitinasyon Üzerine Kurulan Hipotez

Kanserli hücre ölümü kapsamında araştırılması hedeflenen bir ubikitinasyon enzimi olan UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) üzerine hipotez kurulmuştur:

E3 ubiquitin-protein ligazları ubikitinasyon özgünlüğüne ve ardından gerçekleşecek protein degradasyonuna karar vermede çok önemli rol oynamaktadırlar. UHRF1, çeşitli tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunu baskılayan bir epigenetik düzenleyici olan E3 ligazıdır. UHRF1 RING tanıma bölgesi, poliubikitinasyon sağlayarak proteozomal degradasyon için proteinleri hedeflemektedir. Çeşitli çalışmalar, kanser hücrelerinde doğal farmakolojik aktif bileşikler tarafından gerçekleşen UHRF1 ifadesinin azalarak düzenlenmesinin, tümör baskılayıcı gen ifadesini arttırdığını, hücre çoğalmasını baskıladığını ve apoptozu indüklediğini göstermektedir. Bu sebeple, UHRF1 canlı hücrelerde azalarak düzenlenmektedir ve potansiyel ilaç hedefi olabileceği düşünülmektedir.

3.2.3. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış Rko Hücrelerinde Hücre Canlılığı Tayini

Hücre canlılığı üzerindeki etkiyi görmek üzere, UHRF1_3 siRNA ve UHRF1_4 siRNA'larının, lipofektamin ile siRNA verilmesi protokolü uygulanarak RKO hücrelerine transfeksiyonları ile UHRF1 geni susturulmuştur. Bu işlemler için öncelikle, RKO hücreleri 24, 48, 72 ve 96 saat süresince 37 °C' de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmek üzere 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Her bir kuyucuğa 4000 hücre ekilmiştir. Hücre besiyeri olarak %10 Fetal Sığır Serum (FBS), 2mM L-glutamin ve 100 birim/mL penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) isimli besiyer kullanılmıştır. UHRF1 siRNA'ları RNaz içermeyen suda çözüldü. Ardından serum ve antibiyotik içermeyen besi yer ile seyreltilmiştir. Lipofektamin serum ve antibiyotik içermeyen besi yeri ile seyreltilmiştir. Her bir kuyucuğa yapılacak transfeksiyon için 10 pmol oligonükleotit 1 mikrolitre lipofektamin ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Oluşan oligomer-lipofektamin kompleksleri, hücre ve besi yeri içeren kuyucuklara üç tekrarlı şekilde eklenmiştir. Hücreler 37 °C' de CO₂ inkübatöründe 24, 48, 72 ve 96 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sürelerinin sonunda, hücre canlılığı 'CellTiter' Blue metodu ile ölçülmüştür. CellTiter-Blue, Hücre Canlılık Tayini Yöntemi, çok kuyucuklu plakalarda mevcut canlı hücrelerin sayısını tahmin etmek için homojen, florometrik bir yöntem sağlar. Basit protokol, serum destekli ortamda kültürlenmiş hücrelere doğrudan tek bir reaktif eklemeyi içerir. Bu hücre canlılık tayini yöntemi, canlı hücrelerin bir redoks boyayı (resazurin) bir flüoresan son ürüne (resorufin) dönüştürmesi yeteneğine dayanır. Canlı hücreler resazurini oldukça fazla floresans özellik gösteren rezofurine indirgeyebilme kabiliyetine sahiptirler. Ölü hücreler hızla metabolik kapasiteyi kaybeder, indikatör boyasını indirgeyemezler ve bu nedenle bir floresan sinyali üretemezler. Celltiter blue reaktifi her bir kuyucuğa eklendi ve plakalar 37 °C' de iki saat süresince inkübe edilerek hücrelerin resazurini rezofurine çevirmesi sağlanmıştır. Ardından floresan sinyalleri ölçülmüştür. Okunan değerler 560 nmUyarılma/590 nmEmisyon dalga boyunda alınmıştır.

3.2.4. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış Ve İlaç Verilmiş RKO Hücrelerinde Hücre Canlılığı Tayini

RKO hücreleri 72 saat süresince 37 °C' de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmek üzere 96 kuyucuklu plakaya, kuyu başına 4000 hücre düşecek şekilde ekilmiştir. Önceden belirlenmiş IC50 derişim değerlerindeki (IC50 inhibe edici özelliği olduğu bilinen maddenin tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değerini verir) 5-fluorouracil, methotrexate ve paclitaxel ilaçlarının varlığında ve yokluğunda, hücre canlılığı üzerindeki etkiyi görmek üzere, UHRF1_3 siRNA ve UHRF1_4 siRNA' larının, yukarıda anlatıldığı şekilde lipofektamin ile siRNA verilmesi protokolü uygulanarak RKO hücrelerine transfeksiyonu ile UHRF1 geni susturulmuştur. Bu çalışmada, yapılan siRNA transfeksiyonları için 20 pmol oligonükleotit 1 mikrolitre lipofektamin ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra kuyucuklara eklenmiştir. Daha önceki çalışmada en uygun süre olarak belirlenen 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, her bir örneğin hücre canlılığı yukarıda anlatılmış olan Celltiter Blue metoduyla ölçülmüştür.

3.2.5. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri Üzerinde Etiketsiz Proteomiks Çalışması

UHRF1 siRNA transfeksiyonu yapılmış RKO hücreleri üzerinde, UHRF1 siRNA' larının UHRF1'e özgü olduğunu kanıtlamak ve UHRF1' in azalarak düzenlenmesinden etkilenen proteinleri belirleyebilmek adına etiketsiz proteomiks çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, RKO hücreleri 6 kuyucuklu plakalarda, her bir kuyucukta 200000 hücre yoğunluğu olacak şekilde ekilmiştir. UHRF1 siRNA' larının yukarıda anlatılan işlem uygulanarak hücrelere transfeksiyonu yapılmıştır. Her bir kuyucuk için 150 picomol oligomer, seyreltilmiş 5 mikrolitre lipofektamin ile karıştırıldı. 72 saat inkübasyon süresinin sonunda, % 3 sodyum deoksişelat (SDC) içeren liziz tamponu ile hücreler toplanmıştır. 10 dakika süresince gerçekleştirilen inkübasyon sonrasında, ultrasonik homojenizatörde örnekler sonikasyon yapılmıştır (Her örnek için 45 saniye boyunca, %30 genlikte ve 3 saniye atış 3 saniye atışsız olacak şekilde). Proteinler metanol/kloroform çöktürme işlemi uygulanarak çöktürüldü ve 8M üre içeren 50 mM Tris tampon (pH: 8.5) içinde çözünmüştür. Protein derişimi bikinkoninik asit (BCA) protein tayini yöntemi uygulanarak ölçülmüştür. Lowry yönteminin farklı bir uygulaması olan bu teknik, Smith ve

arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Diğer protein tayin yöntemlerine göre daha yenidir ve reaktif olarak BCA kullanılır. Bu yöntem alkali çözeltideki proteinlerin Biüre reaktifi ile Cu^{+2} den Cu^{+1} indirgenmesi ve daha sonra Cu^{+1} in BCA ile verdiği renkli kompleksin 562 nm deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Renk yeşilden koyu mora dönüşür. Protein derişimlerinin ölçülmesinin ardından her bir örnekten 100 mikrogram protein alınarak yeni mikro tüplere aktarılmış ve 8M üre içeren 50 mM Tris tamponu eklenerek hacimler normalize edilmiştir. Son derişim 5mM olacak şekilde örneklere eklenen ditiyotieritol (DTT) ile oda sıcaklığında gerçekleştirilen bir saatlik inkübasyonun sonrasında proteinler indirgenmiştir. Bu işlemin ardından son derişimi 50 mM olacak şekilde iyodoasetamidin (IAA) örneklere eklenmesiyle oda sıcaklığında gerçekleştirilen 1 saat inkübasyonun ardından proteinler alkillenmiştir. Son derişimi 10 mM olacak şekilde fazladan DTT eklendi. Örnekler 50 mM Tris tamponu (pH:8.5) ile üre derişimi 4M olacak şekilde seyreltilmiştir. Lizil endopeptidazı 50 mM Tris tamponu (pH:8.5) içinde çözünmüş ve kütlece 1:100 enzim-protein oranında örneklere eklenerek gece boyunca örnekler enzim ile inkübe edilmiştir. Örnekler, üre derişimi 1M olacak şekilde Tris tampon ile seyreltilmiştir. Tripsin enzimi 50 mM Tris tamponu (pH:8.5) içinde çözünmüştür. Örnekler kütlece 1:100 enzim-protein oranında eklenen tripsin enzimi ile 6 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için örneklere trifloroasetikasit (TFA) eklenmiştir. Örnekler Sep-Pak kullanılarak üretici protokolüne göre temizlenmiş ve Speed-Vac sentifüjlü buharlaştırıcı ile kurutulmuştur. LC-MS/MS analizleri için %2 Asetonitril % 0.1 formic acid içeren çözeltiden örneklere derişimleri 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olacak şekilde eklenmiştir. Peptitler, Q Exactive Plus kütle spektrometresinde, Easy-nanoLC 1000 pompasına bağlı kolonda (EASY-Spray kolonu, 50 cm uzunlukta, 75 μm iç çaplı (ID), PepMap C18, 2 μm parçacık boyutlu, 100 Å gözenek genişliğinde) ayrılmıştır. Örnekler, 250 nanoL/dak. akış hızında, A tamponu (%0.1 formik asit içeren su) ile kolona yüklenmiş ve 260 dakika süresince B tamponunun (%98 ACN, %0.1 formik asit (FA), %2 H_2O) %2' den %95' e kadar aşamalı değişimi ile kolondan elue edilmiştir.

Kütle spektrumları, veri bağımlı modda bir Orbitrap Q Exactive Plus kütle spektrometresi ile elde edilmiş ve tarama aralığı dört saat boyunca 375 ila 1450 m / z arasında tutulmuştur. Peptit parçalanması, yüksek enerjili çarpışma (High Collision

Dissociation, HCD) ile 29 normalize edilmiş çarpışma (Normalized Collision Energy, NCE) enerjisinde gerçekleştirilmiştir. Z=1 iyonları (tek yüklü iyonlar) hariç tutularak iyon seçim bolluğu eşiği % 0.1 olarak belirlenmiştir. MS/MS spektrumları 17500 kütle ayırıcılığında (Reserpin, mol kütlesi: 608.68 g/mol, MSMS ayırıcılığı: 17500) elde edilmiştir. Kütle spektrometrisinden elde edilen ham veriler, Max-Quant, sürüm 1.5.3.8'de peptit ve protein tanımlaması için yürütülmüştür. Microsoft Excel kullanılarak elde edilen veriler analiz edilmiştir.

3.2.6. Ubikitin Kalıntı Motifi (K-E-GG) İmmünoafinite Küreleri' Ni Kullanılarak Hücre Lizatlarından Ubikitinasyona Uğramış Peptitlerin Zenginleştirilmesi İçin UHRF1 siRNA Transefksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri Ve Kontrol RKO Hücreleri Üzerinde Gerçekleştirilen Proteomiks Çalışmaları

Her bir deneysel koşul için yaklaşık 10 mg çözünebilir protein elde edebilecek şekilde RKO hücreleri ekilmiştir. Hücreler, 20 mM 4-(2-hidroksietil)-1-etansülfonik asit (HEPES) pH 8.0 ve 8M üre içeren liziz tampon çözeltisi ile toplanmıştır. Hücre lizatları, mikrouç kullanılarak % 30 genlikte her biri 15 sn'lik 3 atış ile sonike edilmiştir. Lizatlar, 20000 g' de 15 dakika süresince oda sıcaklığında sentrifüjlendikten sonra temizlenmiş ve protein süpernatantı yeni bir tüpe aktarılmıştır. Son derişimi 5 mM olacak şekilde örnekler eklenen DTT ile oda sıcaklığında gerçekleştirilen bir saatlik inkübasyonun sonrasında proteinler indirgenmiştir. Bu işlemin ardından son derişimi 50 mM olacak şekilde IAA çözeltisi örnekler eklenerek oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirilmiş ve proteinler alkilenmiştir. Son derişimi 10 mM olacak şekilde fazladan DTT eklenmiştir. Örnekler üre derişimi 1M olacak şekilde HEPES tampon (pH=8.0) ile seyreltilmiştir. Tripsin enziminin kütlece 1:100 enzim-protein oranında eklenmesinin ardından örnekler gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Peptitlerin saflaştırma işlemleri Sep-Pak kolonlarında oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve örnekler liyofilize edilmiştir. Peptit peletleri 1.4 mL immünoafinite çöktürme tamponu (IAP) içinde çözünmüştür. Antikor kürecikleri bulamacı içeren vialler, küreler üzerindeki tamponu uzaklaştırmak için, 2000 g' de 30 saniye boyunca sentrifüj edilmiştir. Antikor kürecikleri 4 defa 1mL fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Kürecikler üzerine 40 mikrolitre fosfat tamponu eklenmiştir. Peptit çözeltisi içeren örnekler antikor kürecikleri içeren viallere aktarılmış ve 2 saat süresince +4 °C' de inkübe edilmiştir. Örnekler 2000 g' de 30 saniye boyunca sentrifüj edilmiş ve

süpernatantlar atılmıştır. Viallerdeki küreciklere 1mL immünoafinite saflaştırma tamponu (IAP tamponu, 50mM 3-(N-morfolino)propansülfonik asit (MOPS)/NaOH pH 7.2 10 mM Na₂HPO₄ 50 mM NaCl içerir.) eklenip karıştırılmıştır. Bu karışımlar 30 saniye süresince 2000 g' de sentrifüjlenmiş ve süpernatantlar atılmıştır. Viallerdeki küreciklere 1mL su eklenip karıştırılmıştır. Bu karışımlar 30 saniye süresince 2000 g' de sentrifüjlenmiş ve süpernatantlar atılmıştır. 55 mikrolitre hacimce % 0.15 TFA içeren çözelti kürecikler üzerine eklenmiş ve her iki dakikada bir yavaşça karıştırılarak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler 2000 g' de 30 saniye boyunca sentrifüj edilmiş ve süpernatantlar yeni bir tüpe aktarılmıştır. 50 mikrolitre hacimce % 0.15 TFA içeren çözelti kürecikler üzerine eklenmiş ve sentrifüj/elüsyon basamakları tekrarlanmıştır. İki aşamada elde edilen her bir örneğe ait eluentler aynı tüpte birleştirilmiştir. Peptitlerin saflaştırılıp deriştirilmesi StageTip üzerinde gerçekleştirilmiştir. Örnekler, speed-Vac sentifüjlü buharlaştırıcı ile kurutulmuştur. LC-MS/MS analizleri için %2 Asetonitril % 0.1 formik asit çözeltisi, örnek derişimleri 0.2 µg/µl olacak şekilde eklenmiştir. Peptitler, Orbitrap Fusion kütle spektrometresinde, Easy-nanoLC 1000 pompasına bağlı kolonda (EASY-Spray kolonu, 50 cm uzunlukta, 75 µm iç çaplı (ID), PepMap C18, 2 µm parçacıklı, 100 Å gözenek genişliğinde) ayrıldı. Örnekler, 250 nanolitre/dakika akış hızında A tamponu (%0.1 formik asit içeren su) ile kolona yüklenmiş ve 110 dakika süresince B tamponunun (%98 ACN, %0.1 FA, %2 H₂O) %5' den %95' e ulaşması için aşamalı değişimi ile kolondan elue edilmiştir.

Kütle spektrumları, veri bağımlı modda Orbitrap Fusion kütle spektrometresi ile elde edildi ve tarama aralığı dört saat boyunca 350 ila 1500 m / z arasında tutulmuştur. Peptit parçalanması, yüksek enerjili çarpışma ile 30 normalize edilmiş çarpışma enerjisinde gerçekleştirilmiştir. Z=1 iyonları hariç tutularak İyon seçim bolluğu eşiği % 0.1 olarak belirlenmiştir. MS/MS spektrumları 30000 kütle ayırma gücünde elde edilmiştir. Kütle spektrometrsinden elde edilen ham veriler, Max-Quant, sürüm 1.5.3.8'de ubikitinasyona uğramış peptit ve protein tanımlaması için yürütülmüştür. Microsoft Excel kullanılarak elde edilen veriler analiz edilmiştir. Peptit parçalanması, ayrıca, hem yüksek enerjili çarpışmalı ayrıştırma ile hem de elektron transferli ayrıştırma yöntemleri ile Normalize edilmiş çarpışma enerjisi 30 alınarak gerçekleştirilmiştir. Z=1 iyonları hariç tutularak İyon seçim bolluğu eşiği % 0.1 olarak

belirlenmiştir. MS/MS spektrumları 30000 kütle ayırma gücünde elde edilmiştir. Kütle spektrometresinden elde edilen ham veriler, Max-Quant, sürüm 1.5.3.8'de ubikitinasyona uğramış peptit ve protein tanımlaması için yürütülmüştür. Microsoft Excel kullanılarak elde edilen veriler analiz edilmiştir.

3.2.7. Ubikitinasyona Uğramış Proteinleri Ve Peptitleri Belirlemek Amacıyla HCT116, RKO AND A375 Hücreleri Üzerinde Gerçekleştirilen Proteomiks Çalışmalarının Veri Analizleri

3.2.7.1. Protein Analizi

Ubikitinasyona uğramış protein miktarı ve proteinlerin ubikitinasyon bölgeleri belirlenmiştir. Toplamda 5184 protein tanımlanırken, ubikitinasyona uğramış protein sayısı 46 olarak tespit edilmiştir (33 monoubikitinasyona uğramış protein, 9 diubikitinasyona uğramış protein ve 4 poliubikitinasyona uğramış protein). 13 proteinin anlamlı olarak ubikitinasyona uğradığı istatistiki olarak (p değeri < 0.05) tespit edilmiştir. Canlı hücre proteomunda ölü hücrelere göre daha fazla ubikitinasyona uğramış protein olduğu görülmüştür.

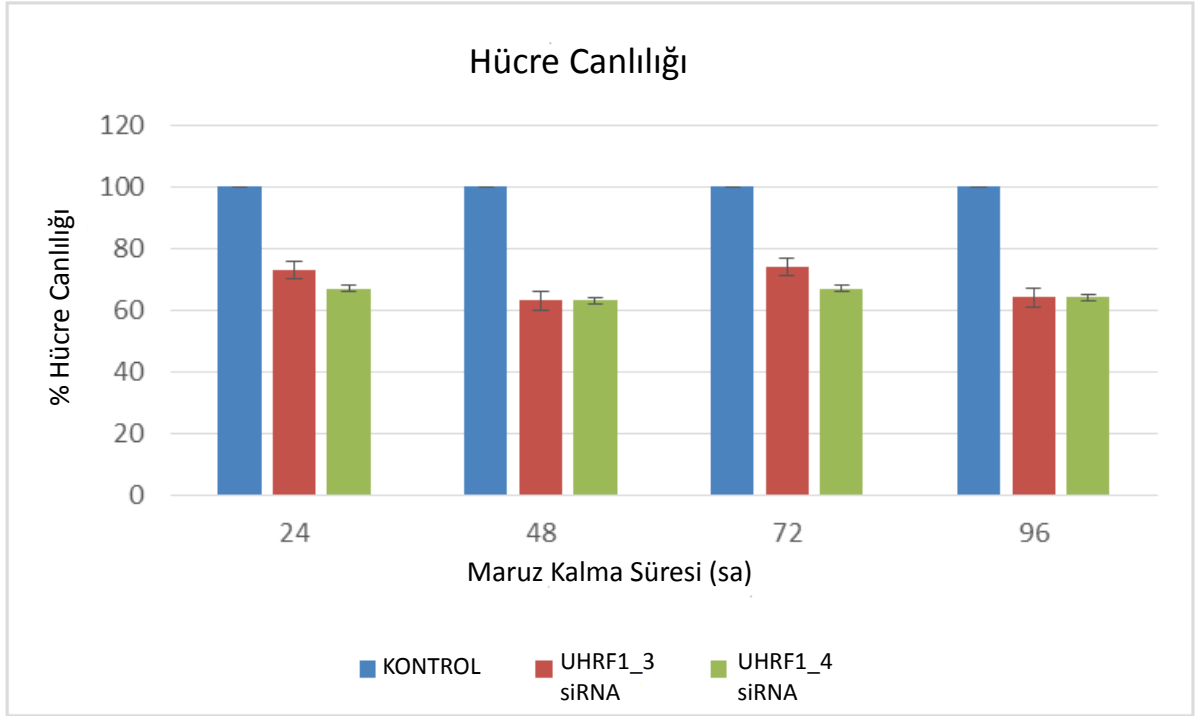
3.2.7.2. Peptit Analizi

Ubikitinasyona uğramış peptit miktarı deneyler sonucunda cihazlardaki yazılımlar ile belirlenmiştir. 59887 peptit arasından 98 tanesinin ubikitinasyona uğradığı görülmüştür. Canlı hücrelerde 75, ölü hücrelerde ise 50 tane ubikitinasyona uğramış peptit tespit edilmiştir. Yine canlı hücrelerdeki ubikitinasyona uğrayan peptit yoğunluğunun ölü hücrelere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 9 tane peptidin canlı ve ölü hücreler arasında anlamlı bir şekilde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu peptitlerin doluluk oranları hesaplanmıştır. Genel olarak, ubikitinasyona uğramış peptit doluluk oranının canlı hücrelerde ölü hücrelere göre daha fazla olduğu söylenebilir.

3.2.8. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış Hücrelerde Hücre Canlılığı Testi Sonuçları

Şekil 3.4.' de mavi bar çubuğu ile gösterilen değerler siRNA verilmemiş kontrol RKO hücrelerine aittir. Kırmızı bar çubukları UHRF1_3 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığı ve yeşil bar çubukları UHRF1_4 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığı

değerlerini ifade etmektedir. Bu şekilde görüldüğü üzere, kırmızı ve yeşil bar çubuklarındaki mavi bar çubuğuna oranla gözlenen değerlerdeki düşüşler, siRNA'ların eklenmesiyle hücre canlılığındaki azalmanın ispatıdır. 24, 48, 72 ve 96 saat süresince gerçekleştirilen inkübasyon sonrası, uygulanan CellTiter-Blue testinden elde edilen sonuçlara göre, UHRF1_3 siRNA ve UHRF1_4 siRNA'ları, RKO hücrelerinin canlılığında zamandan bağımsız bir şekilde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Zaman içerisinde hücre ölümünde ciddi bir artış gözlenmemektedir. Bu çalışma sonucunda gerçekleştirilecek çalışmalarda hücrelerin siRNA'lar ile 72 saat süresince inkübe edilmelerine karar verilmiştir.

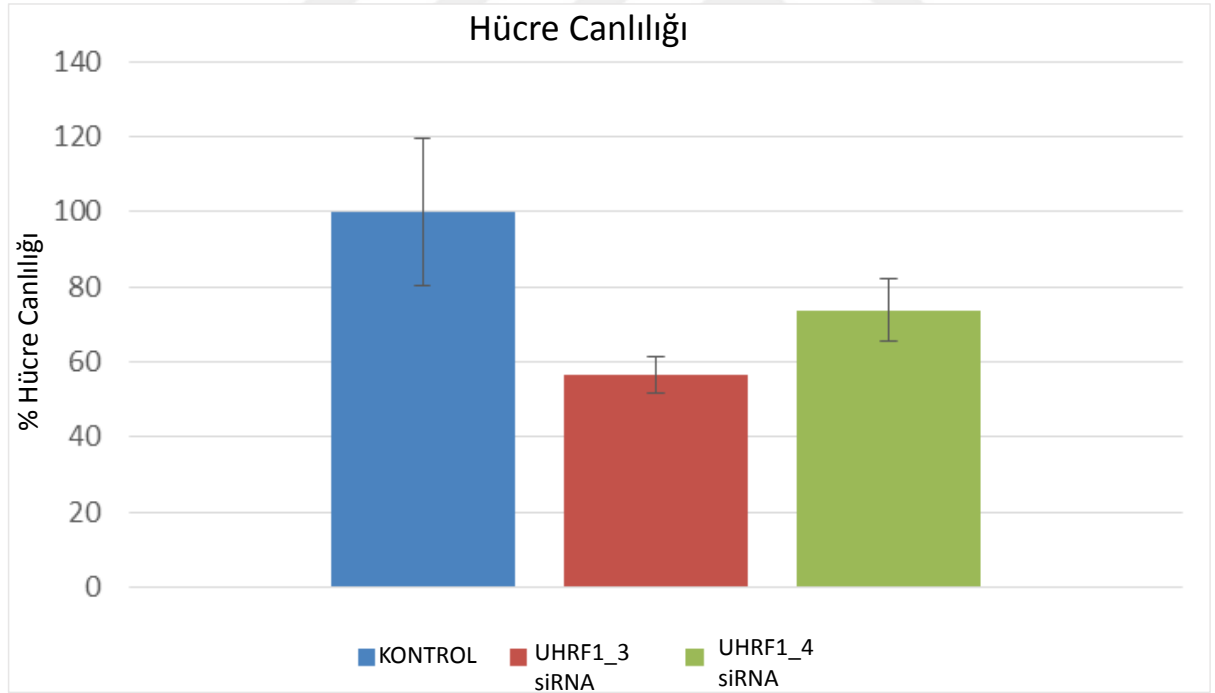


Şekil 3.4. UHRF1_siRNA'lara maruz kalan RKO hücreleri canlılık testi sonucu. Gösterilen değerler siRNA verilmemiş hücrelere ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.

3.2.9. UHRF1 siRNA ve İlaç Transfeksiyonu Yapılmış Hücrelerde Hücre Canlılığı Testi Sonuçları

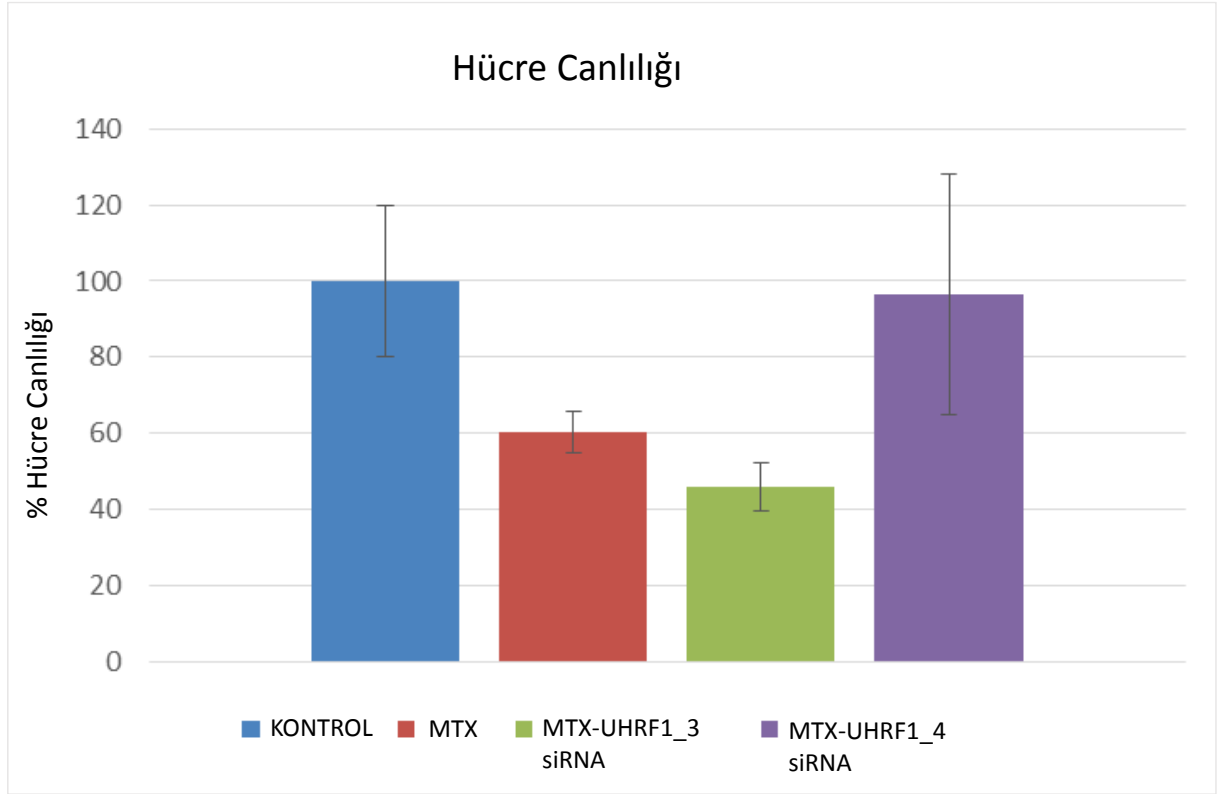
RKO hücrelerine 20 pmol siRNA (UHRF1_3 siRNA ve UHRF1_4siRNA) transfeksiyonu yapılarak 72 saat inkübasyon süresince UHRF1 susturuldu ve hücre

canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 2' de mavi bar çubuğu ile gösterilen değerler siRNA verilmemiş kontrol RKO hücrelerine aittir. Kırmızı bar çubukları UHRF1_3 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığı ve yeşil bar çubukları UHRF1_4 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığı değerlerini ifade etmektedir. UHRF1_3 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığını ifade eden bar çubuğunun ifade ettiği değerin kontrol örneklerindeki hücre canlılığını ifade eden bar çubuğunun gösterdiği değere oranla hücre canlılığında % 44 azalışa neden olduğu görülmektedir. UHRF1_4 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığını ifade eden bar çubuğunun ifade ettiği değerin ise kontrol örneklerindeki hücre canlılığını ifade eden bar çubuğunun gösterdiği değere oranla hücre canlılığında % 26 azalışa neden olduğu görülmektedir. Bu nedenle UHRF1 'in kolon kanseri tedavisinde potansiyel ilaç hedefi olabileceği belirlenmiştir.



Şekil 3.5. UHRF1_siRNA transfeksiyonu yapılmış RKO hücrelerinde hücre canlılığı testi sonucu. Gösterilen değerler siRNA verilmemiş kontrol hücrelerine ait veri %100 alınıp normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.

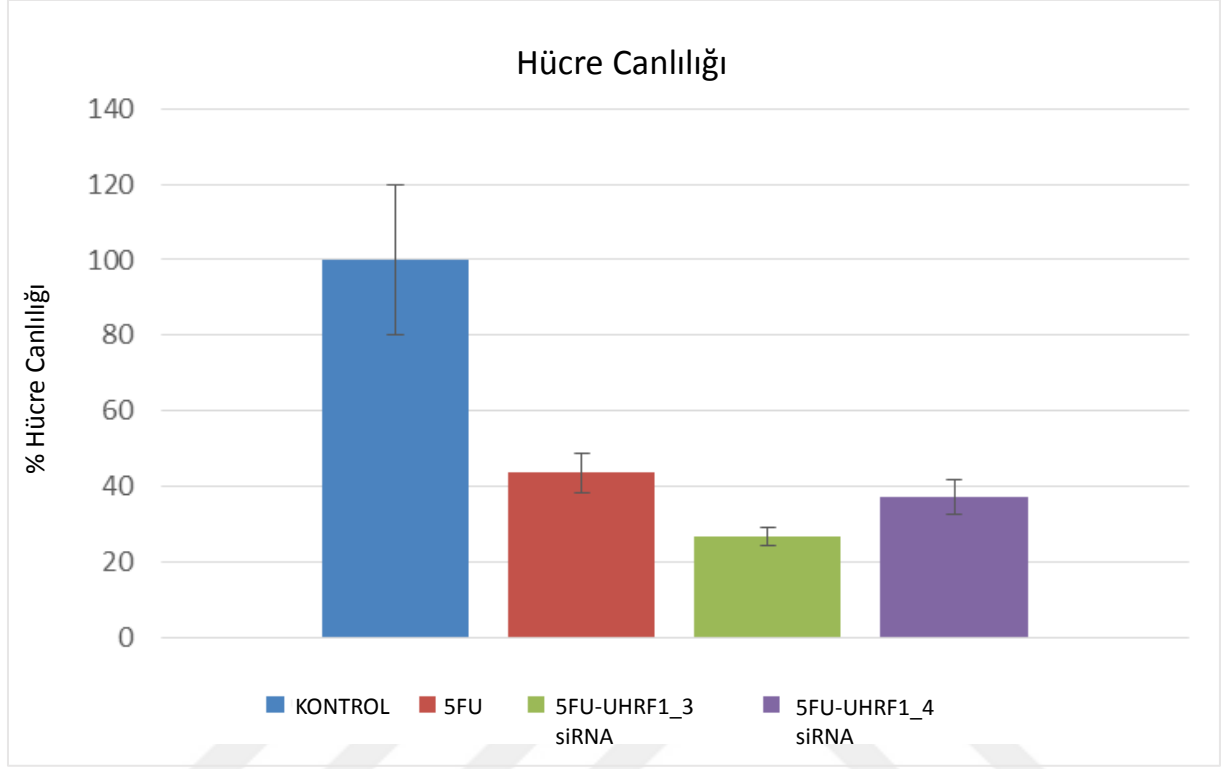
UHRF1 siRNA' larının kanser tedavisinde kullanılan farklı ilaçlarla birleştirilerek hücreye verilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu kombinasyonun hücreleri tedaviye daha duyarlı hale getirip getiremeyeceği incelenmiştir. Şekil 3.6., şekil 3.7. ve şekil 3.8.' de UHRF1 siRNA' ları ile beraber uygun derişimlerdeki farklı kanser ilaçlarının RKO hücrelerine verilmesiyle gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucunda hücre canlılığındaki değışimler gösterilmektedir.



Şekil 3.6. UHRF1 siRNA' ları varlığında ve yokluğunda MTX' e maruz kalan RKO Hücreleri üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı testi sonuçları. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.

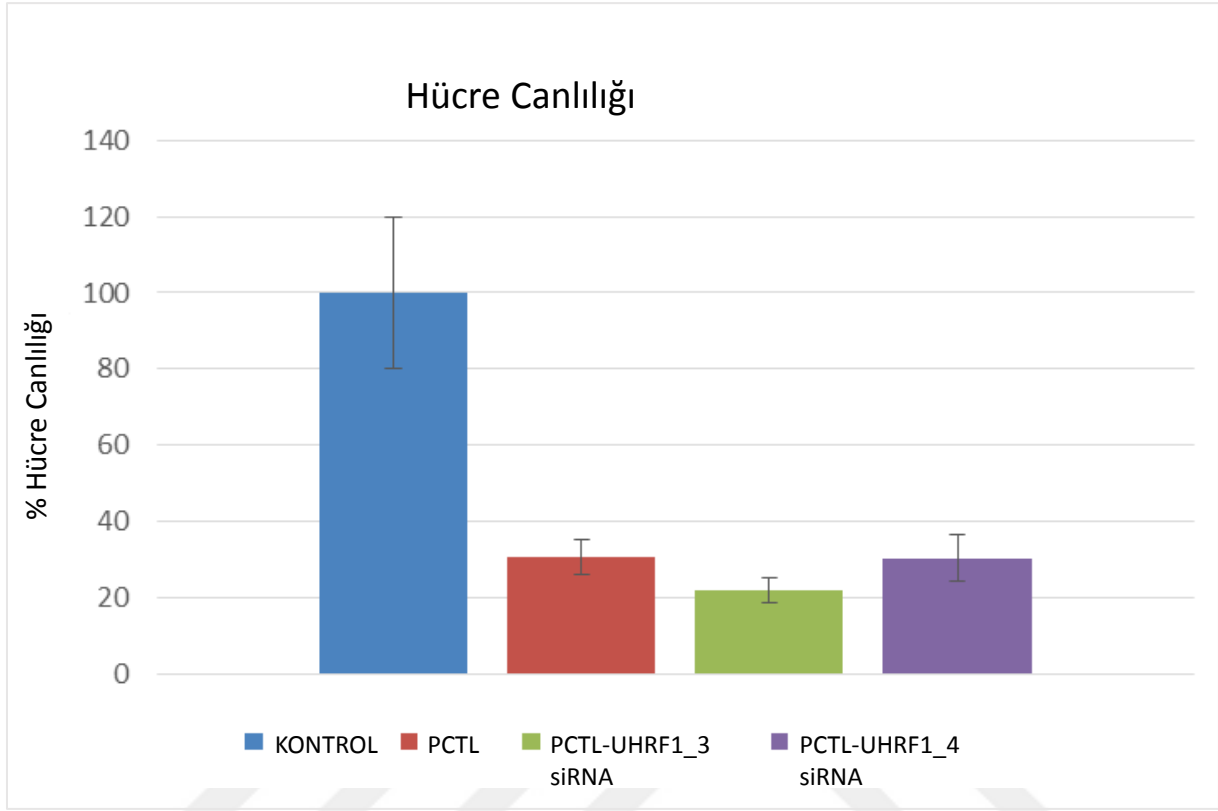
Şekil 3.6' da gösterilen yeşil bar çubuğunun ifade ettiği değer incelenerek sadece MTX ilacı ile inkübe edilen hücrelerdeki canlılığı gösteren kırmızı bar çubuğunun gösterdiği değer ile kıyaslama yapıldığında, MTX ilacı UHRF1_3 siRNA ile hücreye verildiğinde kanser hücrelerinin ilaca karşı hassasiyetini arttırmaktadır. UHRF1_3 siRNA ile beraber hücreye verilen MTX ilacına maruz kalan hücrelerdeki canlılık, hem kontrol hücrelerine hem de sadece MTX ilacı ile inkübe edilen hücrelere göre azalış göstermektedir.

UHRF1_4 siRNA ile hücreye verilen MTX ilacının etkisini ifade eden mor bar çubuğunun gösterdiği değer incelendiğinde ise, UHRF1_4 siRNA' nın ilaca karşı hücre hassasiyetinde herhangi bir artışa sebep olmadığı görülmektedir.



Şekil 3.7. UHRF1 siRNA' ları varlığında ve yokluğunda 5FU' ya maruz kalan RKO Hücreleri üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı testi sonuçları. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.

Şekil 3.7.' de gösterilen mor ve yeşil bar çubuklarının ifade ettiği değerler incelenerek sadece 5FU ilacı ile inkübe edilen hücrelerdeki canlılığı gösteren kırmızı bar çubuğunun gösterdiği değer ile kıyaslama yapıldığında, 5FU ilacı UHRF1_3 siRNA veya UHRF1_4 siRNA ile hücreye verildiğinde kanser hücrelerinin ilaca karşı hassasiyetini arttırmaktadır. UHRF1 siRNA' ları ile beraber hücreye verilen 5FU ilacına maruz kalan hücrelerdeki canlılık, hem kontrol hücrelerine hem de sadece 5FU ilacı ile inkübe edilen hücrelere göre azalış göstermektedir.



Şekil 3.8. UHRF1 siRNA' ları varlığında ve yokluğunda PCTL' ye maruz kalan RKO Hücreleri üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı testi sonuçları. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her örnek için üç tekrar yapılmıştır.

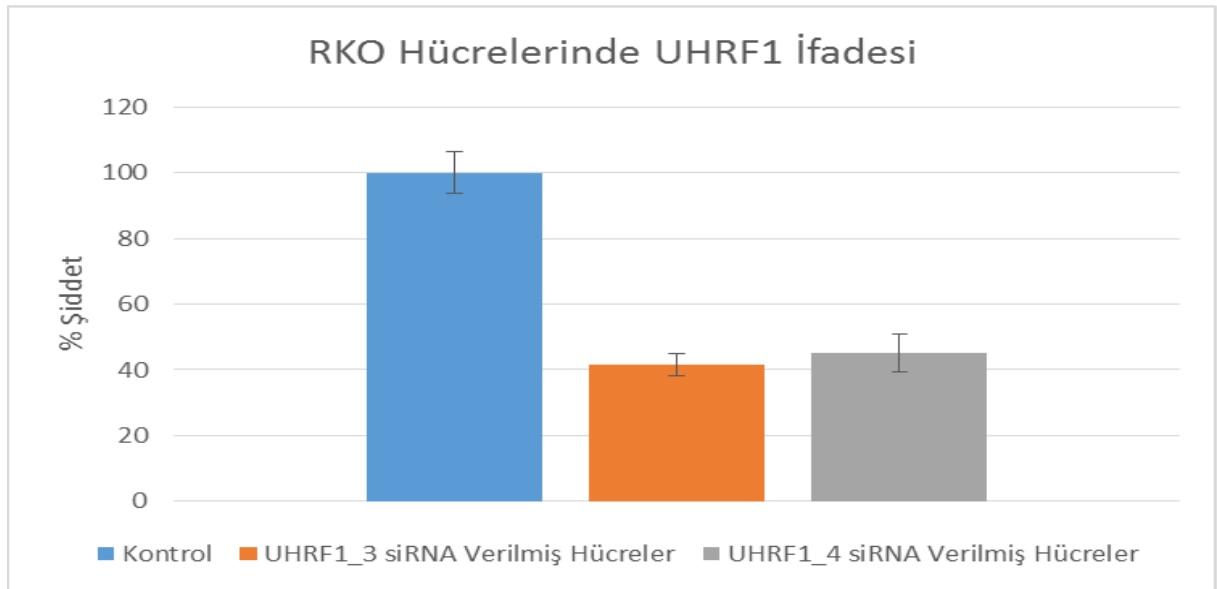
Şekil 3.8.' de gösterilen yeşil bar çubuğunun ifade ettiği değer incelenerek sadece PCTL ilacı ile inkübe edilen hücrelerdeki canlılığı gösteren kırmızı bar çubuğunun gösterdiği değer ile kıyaslama yapıldığında PCTL ilacı UHRF1_3 siRNA ile hücreye verildiğinde kanser hücrelerinin ilaca karşı hassasiyetini arttırmaktadır. UHRF1_3 siRNA ile beraber hücreye verilen PCTL ilacına maruz kalan hücrelerdeki canlılık, hem kontrol hücrelerine hem de sadece PCTL ilacı ile inkübe edilen hücrelere göre azalış göstermektedir.

UHRF1_4 siRNA ile hücreye verilen PCTL ilacının etkisini ifade eden mor bar çubuğunun gösterdiği değer incelendiğinde ise, UHRF1_4 siRNA' nın ilaca karşı hücre hassasiyetinde herhangi bir artışa sebep olmadığı görülmektedir.

Yapılan alışmalar, UHRF1 siRNA' larının RKO hücrelerinin 5FU ilacına karşı hassasiyetini artırdığını göstermiştir. MTX ve PCTL ilaçlarına karşı ise hücre hassasiyetini aşağı yukarı arttırdığı söylenebilir.

3.2.10. UHRF1 siRNA Transfeksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri zerinde Etiketsiz Proteomiks alışması Sonuçları

Gerçekleştirilen çalışmada 4600 protein tanımlanmıştır ve bu proteinlerden 3229 tanesi bütün örneklerde ortak olarak bulunmaktadır. UHRF1, 20 peptit üzerinden tanımlanmıştır ve siRNA' lar ile muamele edilen hücrelerde en çok azalarak düzenlenen protein olarak bulunmuştur. UHRF1_3 siRNA için siRNA/kontrol oranı 0.41 ve UHRF1_4 siRNA için siRNA/kontrol oranı 0.45 iken p değerleri sırasıyla 0.0001 ve 0.0003 olarak hesaplanmıştır. Kontrol hücreleri ve siRNA transfeksiyonu yapılmış hücreler üzerinde gerçekleştirilen her bir deneyin toplam protein yoğunluğuna bağlı olarak veriler normalize edilerek verilmiştir. Bu düzenleme sonrasında, bütün proteinler siRNA verilmiş örneklerin kontrol örneğine oranına göre sıralanmıştır. Bütün örneklerde toplamda 30 tane ubiquitinasyona uğramış protein tayin edilebilmiştir.



şekil 3.9. UHRF1_ siRNA verilmiş RKO Hücrelerinde etiketsiz proteomiks alışması. Gösterilen değerler kontrol hücrelerine ait veri %100 alınarak normalize edilerek verilmiştir. Her rnek için üç tekrar yapılmıştır.

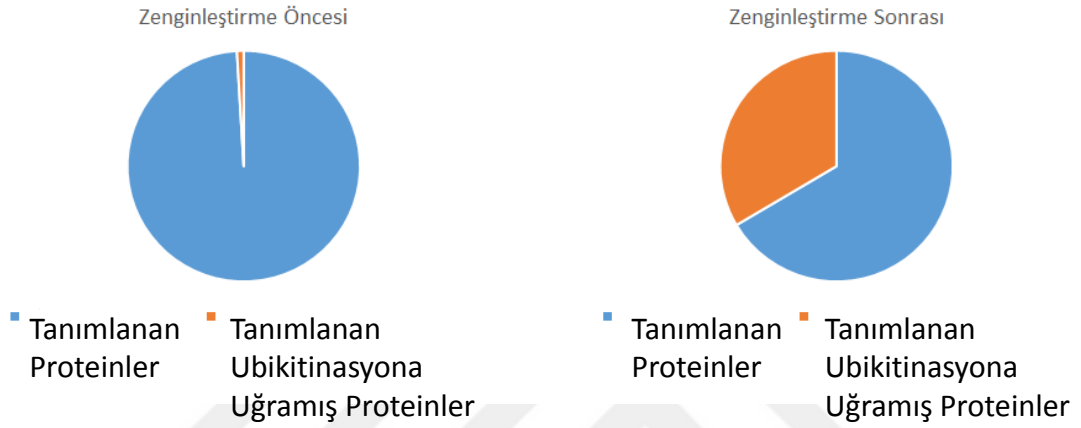
Şekil 3.9.' da görüldüğü üzere, turuncu ve gri bar çubukları ile verilen UHRF1 siRNA' ları ile inkübe edilen hücrelerde mavi bar çubuğu ile verilen kontrol hücrelerine oranla UHRF1 ifadelerinde oldukça yüksek düşüşler gözlenmektedir. UHRF1 siRNA' ları ile inkübe edilen hücrelerdeki UHRF1 ifadesi kontrol hücrelerindeki UHRF1 ifadesi ile istatistiksel olarak kıyaslandığında siRNA verilen hücrelerde UHRF1 en fazla down-regüle olan protein olarak bulunmuştur. Bu durum, UHRF1 siRNA' larının UHRF1' e özgü olduğunu ispatlamaktadır.

3.2.11. Ubikitin Kalıntı Motifi (K-E-GG) İmmünoafinite Küreleri' Ni Kullanılarak Hücre Lizatlarından Ubikitinasyona Uğramış Peptitlerin Zenginleştirilmesi İçin UHRF1 SİRNA Transefeksiyonu Yapılmış RKO Hücreleri Ve Kontrol RKO Hücreleri Üzerinde Gerçekleştirilen Proteomiks Çalışmaları Sonuçları

3.2.11.1. Maxquant Proteomik Yazılım Sistemi İle Analiz

siRNA transfeksiyonu yapılmış RKO ve kontrol RKO hücrelerinden gelen proteinler üzerinde gerçekleştirilen proteomik çalışmaları sonucunda, elde edilen peptitler üzerinde yürütülen immünoafinite çöktürmesi ile gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarından sonra tespit edilen ubikitinasyona uğramış proteinlerin sayısında 20 kat artış gözlenmiştir (şekil 3.10.). Dolayısıyla, daha fazla sayıda ubikitinasyona uğramış protein belirleyebilmek için, tripsin enzimi ile proteinlerin parçalanması sonucu elde edilen peptitler üzerinde ubikitinasyon tayinine özgü etkin bir zenginleştirme işleminin gerçekleştirilmesinin zorunlu olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer yöntemlere kıyasla ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesi için en uygun yöntem bazı dezavantajlarına rağmen immünoafinite çöktürmesidir. Bu yöntemde proteinler hücre lizatlarından ekstrakte edilirler ve tripsin ile parçalamaya uğratılırlar. Bu işlemlerin sonrasında, ubikitin kalıntısı içeren peptitler anti-diglisin lizin antikorları kullanılarak immünoafinite çöktürmesi ile zenginleştirilirler. Bu peptitlerin tayini modifikasyona uğramış hedef proteinin lizini üzerindeki 114 daltonluk kütle farkı üzerinden izlenir. Bu tekniğe ubikitin kalıntısı profillemeye adı verilmektedir. Ubikitin kalıntısı profillemeye tekniği, ubikitinasyon olaylarının yüksek verimli bir şekilde tanımlanmasının etkinliğini önemli ölçüde artırır. Özetle, ubikitin kalıntısı profillemeye yaklaşımı, kompleks triptik parçalanma ürünlerinden diglisin ile modifiye edilmiş peptitleri önemli ölçüde zenginleştirebilir ve protein ubikitinasyon bölgelerinin

tanımlanmasında yanlış keşif oranını (false discovery rate) azaltabilir. Ancak, bu yöntem oldukça pahalı ve hassas bir yöntemdir. Tekrarlanabilir sonuçlar alınması zordur. Üretilen anti-diglisin lizin motiflerindeki verimlilik bir setten diğer bir sete farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca bu motiflerle inkübasyon sonrasında gerçekleştirilen yıkama şartları özgün olamayan etkileşimlerle bağlanmış diğer proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılmasında yeterli gelemeyebilmektedir.



Şekil 3.10. Ubikitinasyona Uğramış Peptitlerin Antikor Kullanılarak Zenginleştirilmesi ve Proteomik Analizi.

3.2.11.2. Quanti Proteomik Yazılım Sistemi İle Analiz

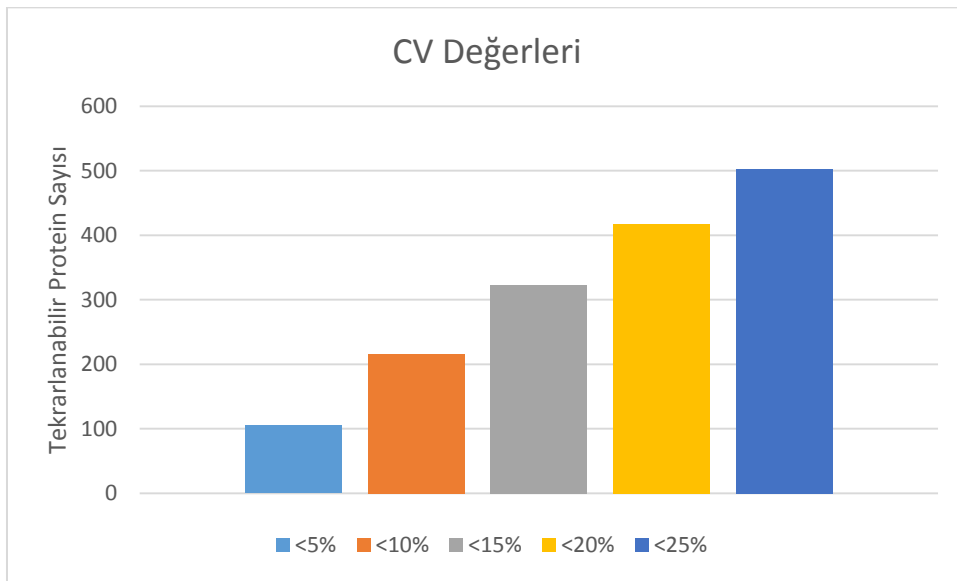
Protein Analizi

UHRF1 siRNA' ları ile inkübe edilmiş ve edilmemiş kontrol örnekleri tripsin ile parçalanıp ubikitinasyona uğrayan peptitler immünoafinite çöktürmesi ile zenginleştirildikten sonra yapılan kütle spektrometrik analizler sonucu elde edilen ham veriler Max-Quant, sürüm 1.5.3.8'de ubikitinasyona uğramış peptit ve protein tanımlaması için yürütüldükten sonra Microsoft Excel kullanılarak analiz edilmiştir ve Tablo1 de belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır. Protein düzeyinde yapılan analizler sonucunda, tüm örnekler için varyasyon katsayısı (Coefficient of variation, CV, standart sapmanın ortalamaya göre % değişimi) %10' dan küçük olacak şekilde 216 tane tekrarlanabilir protein belirlenmiştir. UHRF1 siRNA' ları ile inkübe edildikten sonra zenginleştirilen örnekler siRNA ile inkübe edilmeden zenginleştirilen kontrol örnekleri ile kıyaslandığında ubikitinasyona uğrayan 3 tane proteinin miktarının iki kat

arttığı, 5 proteinin ise miktarının yarıya düştüğü belirlenmiştir. Kontrol örnekleri hariç tutulduğunda, sadece siRNA inkübasyonunun ardından zenginleştirilmiş örneklerde tayin edilen ubiquitinasyona uğramış protein sayısı ise 8 tane olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, UHRF1' in miktarının azalarak düzenlenmesinin hücrede ubiquitinasyona uğramış protein sayısını azalttığını göstermektedir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik protein analiz sonuçları.

Ubikitinasyona Uğramış Protein Yüzdesi	60
Tekrarlanabilir protein sayısı < 10% Cv	216
Miktarı İki Kat Artan Protein Sayısı	3
Miktarı Yarıya Düşen Protein Sayısı	5
Yalnızca UHRF1 siRNA verilmiş ve zenginleştirilmiş örneklerde tayin edilen protein sayısı	8



Şekil 3.11. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik analiz sonuçlarına göre hesaplanan CV değerlerine göre tekrarlanabilir protein sayısı.

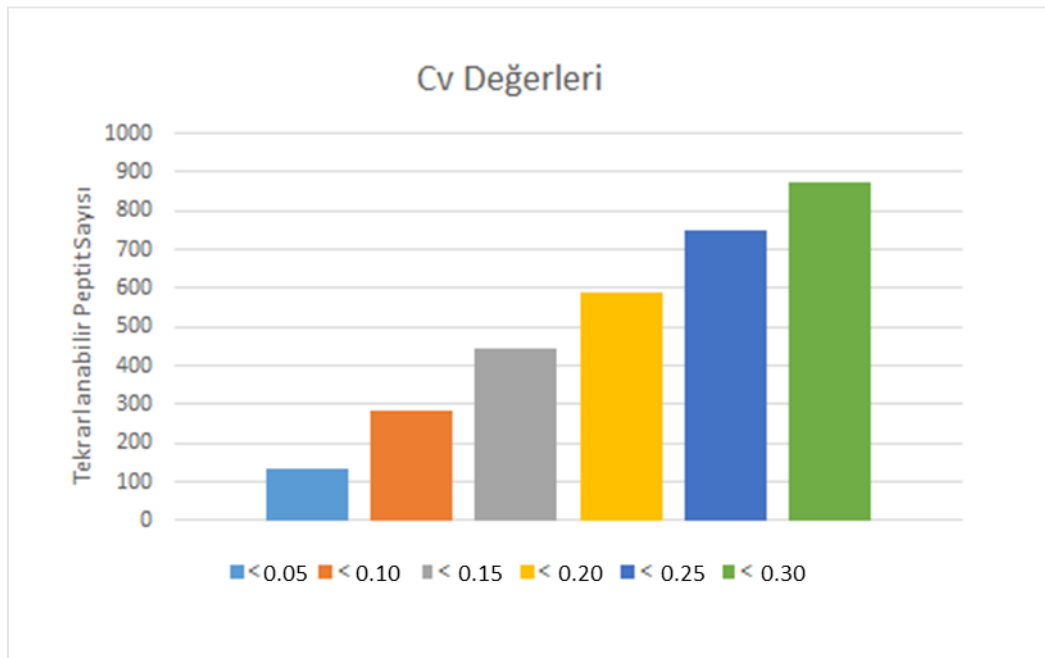
UHRF1 siRNA inkübe edilmiş ve siRNA ile etkileştirilmemiş kontrol örnekleri zenginleştirildikten sonra bu iki grup varyasyonlarını, verilerin büyüklüğünden doğan farklılığı standardize ederek kıyaslamak adına CV değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısı arttıkça dağılımları daha fazla değişim gösteren tekrarlanabilir proteinlerin sayılarının arttığı Şekil 3.11. de görülmektedir.

Peptit Analizi

Peptit düzeyinde yapılan analizler soucunda, tüm örnekler için 1551 tane ubikitinasyona uğramış peptit tanımlandı. Bu peptitler arasında varyasyon katsayısı % 20' den küçük olacak şekilde 589 tane tekrarlanabilir peptit belirlenmiştir. UHRF1 siRNA' ları ile inkübe edildikten sonra zenginleştirilen örnekler siRNA ile inkübe edilmeden zenginleştirilen kontrol örnekleri ile kıyaslandığında ubikitinasyona uğrayan 17 tane peptit miktarının iki kat arttığı, 11 peptidin ise miktarının yarıya düştüğü belirlenmiştir. Kontrol örnekleri hariç tutulduğunda, sadece siRNA inkübasyonunun ardından zenginleştirilmiş örneklerde tayin edilen ubikitinasyona uğramış peptit sayısı ise 156 tane olarak hesaplanmıştır ve bu peptitlerin 54 tanesinin CV değeri % 20' nin altındadır (Tablo 3.2.). Bu değerler, UHRF1' in miktarının azalarak düzenlenmesinin hücrede ubikitinasyona uğramış peptit sayısını azalttığını göstermektedir.

Tablo 3.2. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik peptit analiz sonuçları.

Ubikitinasyona Uğramış Peptit sayısı	1551
Tekrar edebilir peptit sayısı < 20% Cv	589
Miktarı İki Kat Artan Peptit Sayısı	17
Miktarı Yarıya Düşen Peptit Sayısı	11
Yalnızca UHRF1 siRNA verilmiş ve zenginleştirilmiş örneklerde tayin edilen peptit sayısı	156 54 < 20% Cv



Şekil 3.12. Ubikitinasyona uğramış peptitlerin zenginleştirilmesinin ardından elde edilen Quanti proteomik analiz sonuçlarına göre hesaplanan CV değerlerine göre tekrarlanabilir peptit sayısı.

UHRF1 siRNA inkübe edilmiş ve siRNA ile etkileştirilmemiş kontrol örnekleri zenginleştirildikten sonra bu iki grup varyasyonlarını, verilerin büyüklüğünden doğan farklılığı standardize ederek kıyaslamak adına CV değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısı arttıkça dağılımları daha fazla değişim gösteren tekrarlanabilir peptitlerin sayılarının arttığı Şekil 3.12. de görülmektedir.

3.3. Bölüm 3: Ubikitinasyona Uğramış Peptidlerin Zenginleştirilmesi İçin Kullanılabilecek Yüzeylerin Belirlenmesi

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda ubikitinasyona uğramış proteinlerin tayini ve ubikitinasyon bölgelerinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için tripsin parçalaması sonucu elde edilen peptidler üzerinde ubikitinasyon tayinine özgü etkin bir zenginleştirme işleminin gerçekleştirilmesinin şart olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni ise ubikitinasyona uğramış proteinlerin ve doğal olarak tripsin enzimi ile parçalanmalarından oluşacak ubikitine olmuş peptidlerinin ubikitinasyona uğramayan miktarlarına göre çok daha düşük olmasından dolayıdır. Bu amaçla kullanılan en etkin yöntem anti-diglisin-lizin antikorlarının kullanılmasıyla ubikitin kalıntı peptidinin tanımlanmasıdır. Ancak bu yöntemin oldukça pahalı olması ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması, yeni yaklaşım ve metodların geliştirilmesi ihtiyacını doğurmaktadır. Literatürde ucuz ve etkin çalışabilen protein zenginleştirme yöntemleri mevcuttur. Proteinler ya da peptidler zenginleştirme amaçlı metal immobilize edilmiş yüzeyler [101-103], amin, sülfonil gibi fonksiyonel gruplar içeren malzemeler [104, 105], pamuk, ipek [106] gibi çeşitli yüzeyler üzerinde immobilize edilebilmektedir. Bu yöntemlerin ubikitinasyona uğramış peptid zenginleştirilmesine uyarlanabilirliğini denemek amacıyla, tez çalışmaları kapsamındaki son kısımda, farklı yüzeyler üzerinde, UbiQ firmasından ticari olarak temin edilmiş, monoubikitinasyona uğramış standart bir peptid olan Histon 2B' nin (Biotin-AHX-H2B (106-125) K120 UB) parçalanma ürünleri inkübe edildikten sonra, ubikitinasyona uğramış 1098 Da kütledeki peptidin (UB- (K)AVTKYTSSK) kütle spektrometrik sinyalleri şiddetleri izlenerek, ileri çalışmalarda zenginleştirme amaçlı kullanılabilecek en uygun yüzey belirlenmeye çalışılmıştır.

3.3.1. Kullanılan Yüzeyler

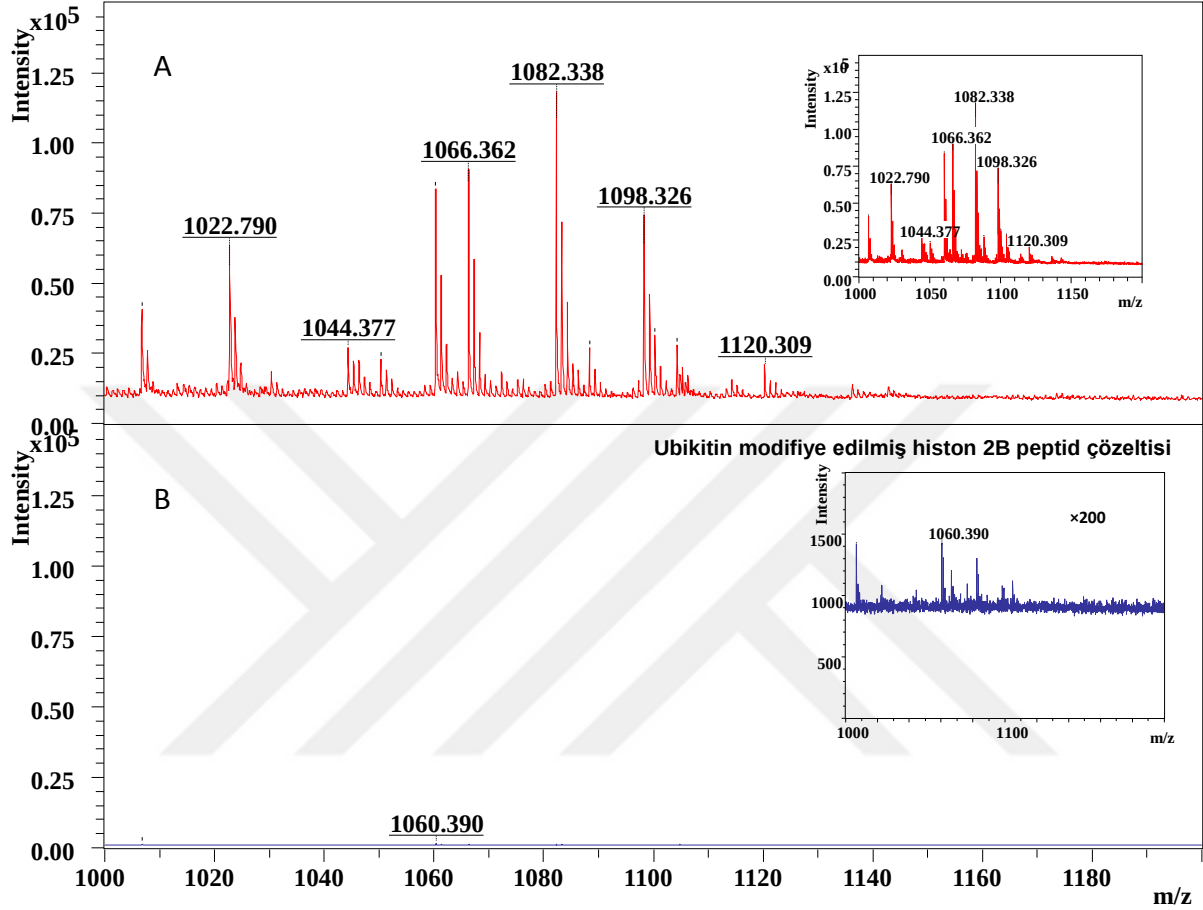
Sülfonik asit fonksiyonel grubu içeren 217506 kodlu Dowex® 50WX8 (hydrogen form 100-200 mesh) ürünü Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Titanyum, zirkonyum, poli-L-lizin (PLL), poli-L-arjinin (PLA) ve poli-L-ornitin (PLO) içeren sol-jel malzemeler laboratuvarımızda sentezlenmiştir. Pamuk kozmetik marka ürünü olarak satın alınmıştır. İpek, S.S Bursa Koza Tarım Satış Kooperatifleri Birliği' nden satın alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasalların tümü Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır.

3.3.2. Sülfonik Asit Fonksiyonel Grubu İçeren Adsorban Üzerinde Zenginleştirme

3.3.2.1. Sülfonik Asit Fonksiyonel Grubu İçeren Adsorban Üzerinde Zenginleştirme Yöntemi

Bu adsorbenden 5 mg lık bir miktar tartıldıktan sonra su:asetonitril (1:1, v/v %1.0 TFA içeren) yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından yüzey üzerine 50 µL yıkama çözeltisi, 10 µL asetonitril ve tripsin enzimi ile parçalanmış ubikitinasyona uğramış 1 mikrogram/ µL derişimindeki Histon 2B peptid çözeltisinden 5 µL eklenerek yarım saat süresince inkübe edilmiştir. Yıkama çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen yıkama işlemlerinin ardından 20 µL 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ve 5 µL NH₃ (%25, w/w) yüzeye eklenerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elüe edilen numuneler, α-siyano-4-hidroksi sinnamik asit çözeltisi (1:1, v/v) ile karıştırılarak MALDI-ToF-MS (Rapiflex, Bruker-Almanya) cihazı ile analiz edilmiştir.

3.3.2.2. Sülfonik Asit Fonksiyonel Grubu İçeren Adsorben Üzerinde Zenginleştirme Verileri ve Sonuçları



Şekil 3.13. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin sülfonil fonksiyonel grupları içeren malzeme ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen MALDI-ToF-MS spektrumu ve (B) zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumu.

Sülfonil fonksiyonel grubu içeren yüzeyler üzerinde gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarında, asidik ortamda yüzeye peptid yüklemesi, bazik ortamda yüzeyden peptid desorpsiyonu yapılmıştır. Asidik ortamda yüzeydeki sülfonil grupları negatif yüke sahiptir. Bu şartlarda, peptidlerin amin grupları pozitif yüklü olacağından, peptidler malzeme üzerine tutunurlar. Ancak ortam pH değeri 10 civarına getirildiğinde, yüzeydeki sülfonil grupları oldukça negatif olurken, peptidlerin amin grupları ilk baştaki pozitif yüklerini kaybederler; nötral yüke sahip olurlar. Böylece,

peptidler yüzeyden desorbe olurlar. Bu temel etkileşimler hedef alınarak, sülfonil fonksiyonel grubuna sahip yüzeyler üzerinde gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmasında, hedef peptidin 200 kat zenginleştirildiği görülmüştür (şekil 3.13.). Bu tür bir zenginleştirme sonucunda miktarı çok düşük olan ve peptid karışımında bulunan ubikitinasyona uğramış peptid zenginleştirilmesi sonrasında LC-MS çalışmalarında gözlemlenebilme ve tanımlanabilme derişimlerine ulaştırılabildiği tespit edilmiştir.

3.3.3. Metal İçeren Sol-Jel Yüzeylerde Zenginleştirme

3.3.3.1. Metal İçeren Sol-Jel Sentez Yöntemi

Titanyum(IV) izopropoksit, tantal(V) etoksit çözeltileri ve zirkonyum(IV) etoksit katısı etanol/su (8:1, hacimce) karışımları içerisinde ayrı ayrı çözüldükten sonra HNO₃ katalizörü varlığında farklı özellikli sol-jel malzemeleri sentezlenmiştir. Kullanılan malzemelerin isimleri ve sentezleri sırasında kullanılan kimyasalların miktarları, tablo 3.3' te verilmiştir.

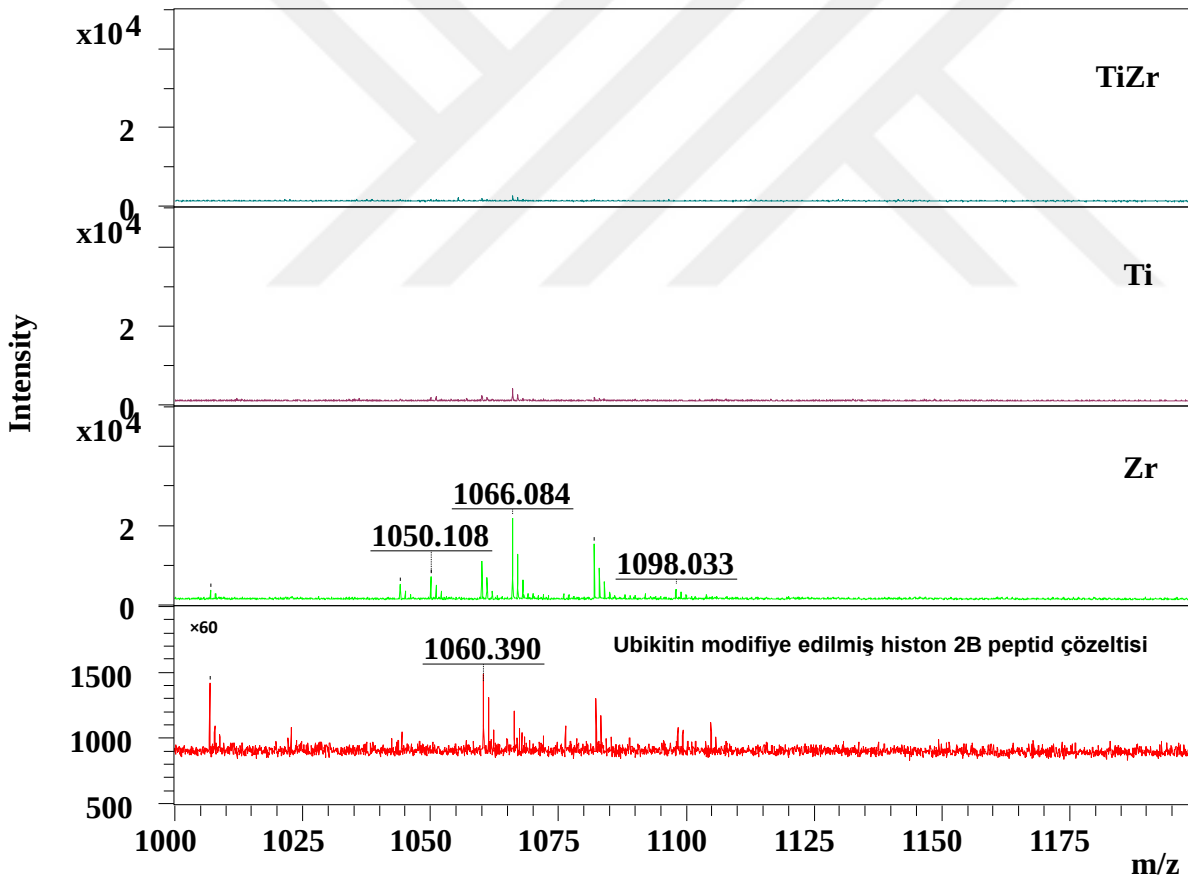
Tablo 3.3. Metal içeren sol-jellerin sentezleri sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Sol-jel Adı	Metal Alkoksit Türü ve Miktarı	Çözücü Cinsi ve Miktarı	Su Miktarı	Asit Türü ve Miktarı
Titanyum	Titanyum (IV) İzopropoksit, (3.0 mL)	Etanol (1.6 mL)	0.18 mL	HNO ₃ (75 µL)
Zirkonyum	Zirkonyum (IV) etoksit (3.0 g)	Etanol (1.6 mL)	0.18 mL	HNO ₃ (75 µL)
Titanyum-Zirkonyum	Titanyum (IV) İzopropoksit (610 µL) + Zirkonyum (IV) etoksit (0.56 g)	Etanol (1.77 mL)	360 µL	HNO ₃ (28 µL)

3.3.3.2. Metal İçeren Sol-Jel Yüzeylerde Zenginleştirme Yöntemi

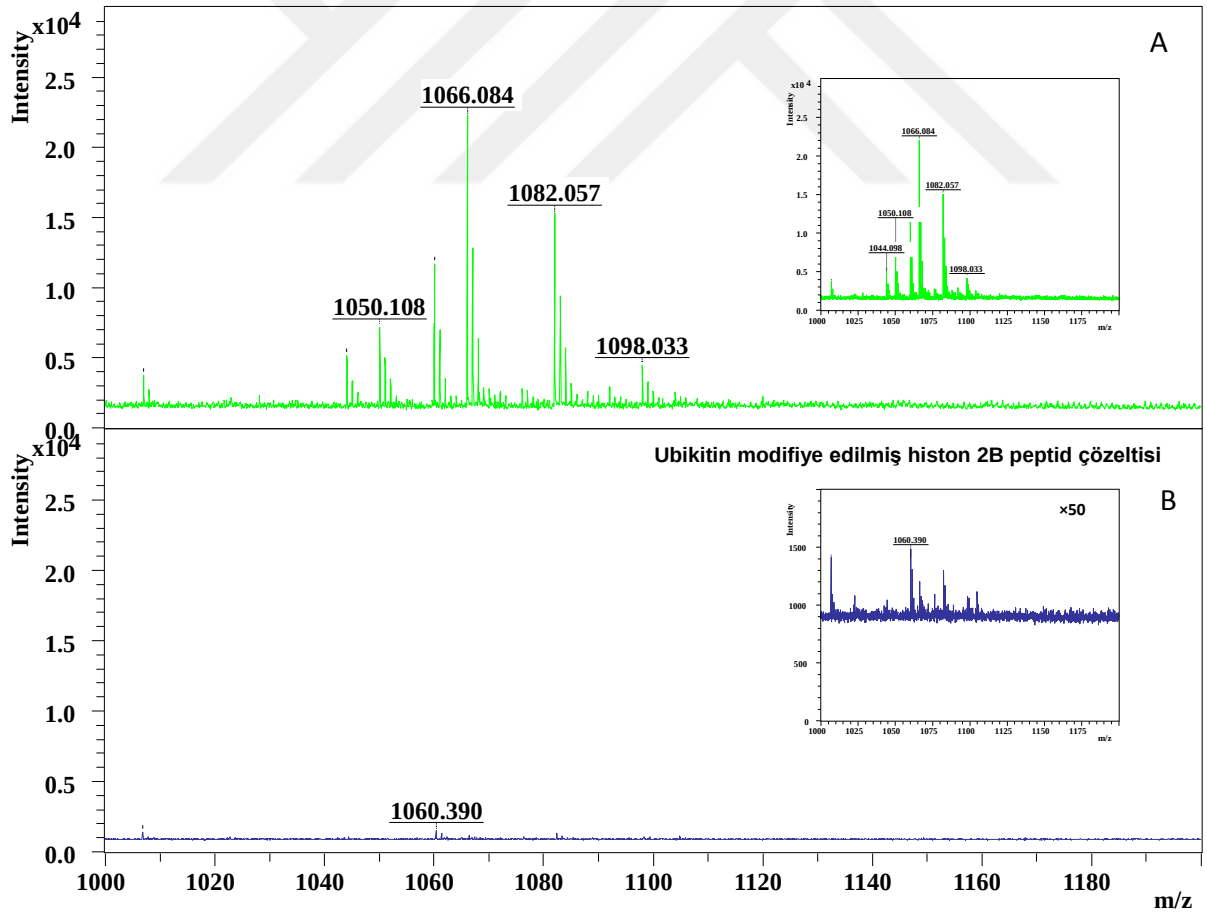
Sentezlenen sol-jel lerden 5'er mg alınarak, su ile yıkandıktan sonra, 100 µL su, tripsin enzimi ile parçalanmış ubikitinasyona uğramış 1 mikrogram/ µL derişiminde Histon 2B peptid çözeltisi (5 µL) ve 5 µL amonyak çözeltisi (%25, w/w) eklenerek bazik ortamda oda sıcaklığında yarım saat süresince inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Su ile yapılan yıkama işlemlerinin ardından yüzeye 5 µL TFA eklenerek, asidik ortamda desorpsiyon yapılmıştır. Elüe edilen numuneler, α-siyano-4-hidroksi sinnamik asit çözeltisi (1:1, v/v) ile karıştırılarak MALDI-ToF-MS cihazı ile analiz edilmiştir.

3.3.3.3. Metal İçeren Sol-Jel Yüzeylerde Zenginleştirme Verileri Ve Sonuçları



Şekil 3.14. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin geçiş metal temelli sol-jeller ile zenginleştirilmesinin sonraki MALDI-TOF-MS spektrumları.

Bazik ortamda gerçekleştirilen yüzey-peptid etkileşimlerinde, yüzeyin nötral ya da negatif yüklenip peptidlerin amin gruplarının pozitif kalması ile gerçekleşecek elektrostatik etkileşimden yararlanarak, hedef peptidin yüzeye bağlanması hedeflenmiştir. Asidik ortamda ise, pozitif yüklenmesi beklenen metalik yüzeyden, pozitif yüklü amin grupları içeren peptidlerin desorpsiyonu sağlanmıştır. Denenen geçiş metal temelli sol-jel yüzeyler içerisinde sadece zirkonyum temelli sol-jel ile gerçekleştirilen çalışmada ubikitinasyona uğramış peptid zenginleştirilebilmiştir. Ancak, titanyum temelli ve titanyum-zirkonyum temelli sol-jeller ile yapılan çalışmalarda zenginleştirme gözlemlenememiştir (Şekil 3.14). Titanyum ve zirkonyuma ait ekte verilen Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM) görüntüleri karşılaştırıldığında, zirkonyumun yüzeyinin titanyumun yüzeyine göre daha gözenekli olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, peptidlerin gözenekli yüzeye daha iyi tutunması beklenir ve Zr temelli sol jel malzeme kullanılarak yürütülen çalışmada, daha yüksek verimde zenginleştirme sağlanmıştır.



Şekil 3.15. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin Zr temelli sol-jel ile zenginleştirilmesinden sonra ve (B) zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.

Zirkonyum temelli sol-jel ile gerçekleştirilen çalışmada ubikitinasyona uğramış peptid 35 kat zenginleştirilmiştir (Şekil 3.15.).

3.3.4. PAMUK ve İPEK ÜZERİNDE ZENGİNLEŞTİRME

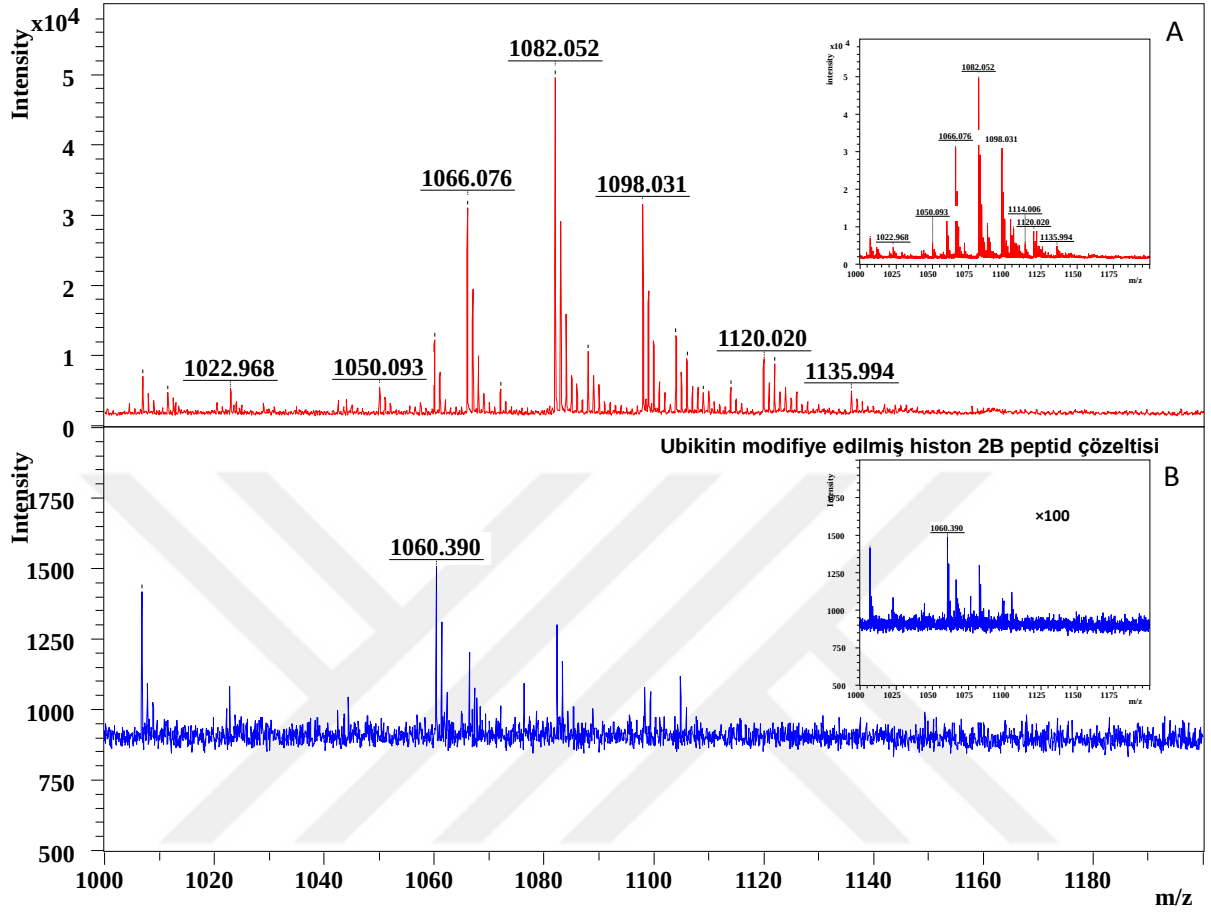
3.3.4.1. Pamuk Ve İpek Üzerinde Zenginleştirme Yöntemi

Pipet ucuna yerleştirilen malzeme üç kez su ile yıkanmıştır. Ardından, % 85 asetonitril çözeltisi kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. 28 µL asetonitril ve tripsin enzimi ile parçalanmış ubikitinasyona uğramış 1 µg/ µL derişiminde Histon 2B peptid çözeltisinin 5 µL' si malzemeye etkileştirilmiştir. Sonrasında, su:asetonitril:Trifloroasetik asit (14:85:1, v/v) çözeltisi ve ardından % 85 asetonitril çözeltisi ile yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Son olarak, 10 µL su ile desorpsiyon yapılmıştır. Elüe edilen numuneler, α-siyano-4-hidroksi sinnamik asit çözeltisi (1:1, v/v) ile karıştırılarak MALDI-ToF-MS cihazı ile analiz edilmiştir.

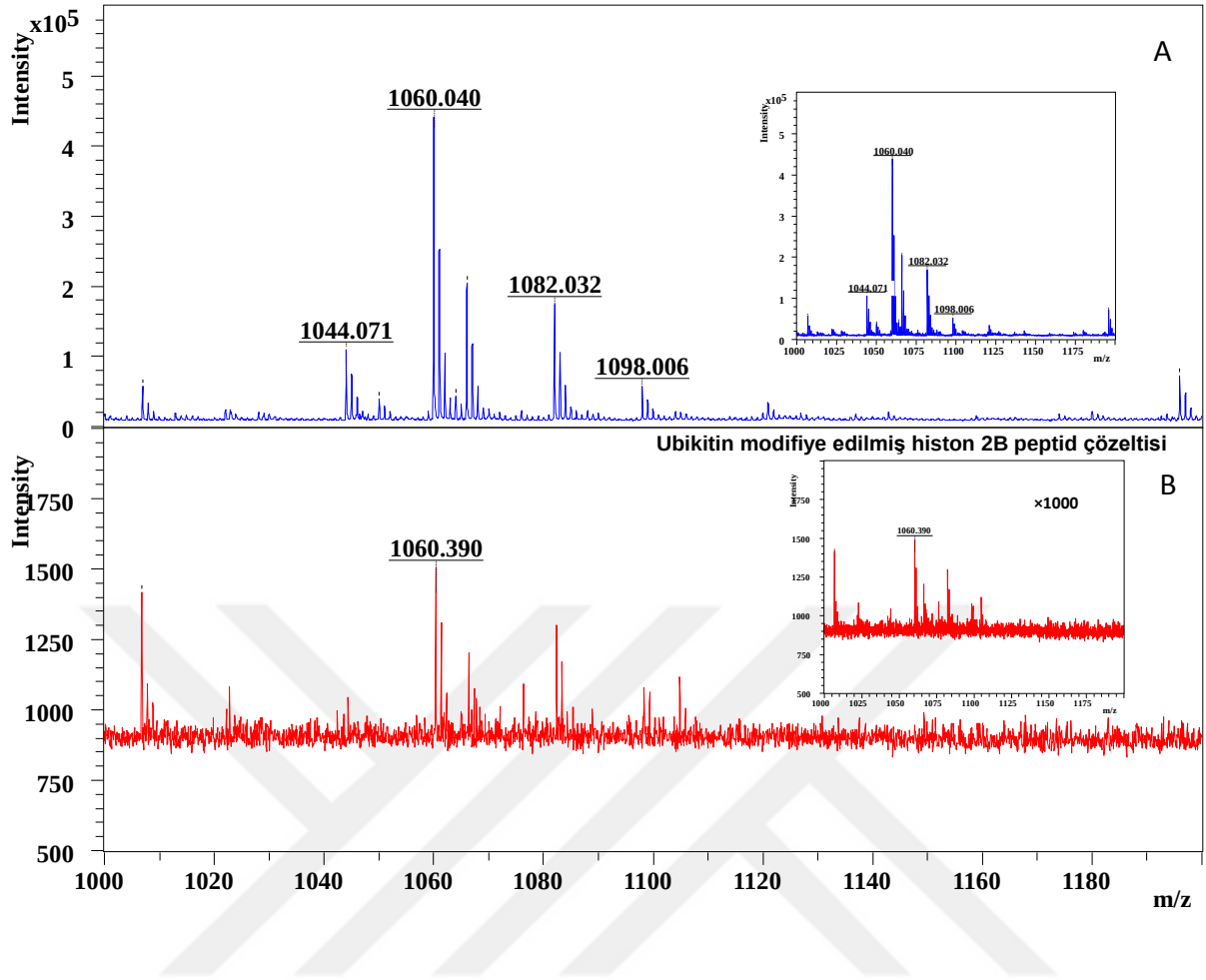
3.3.4.2. Pamuk ve İpek Üzerinde Zenginleştirme Verileri ve Sonuçları

Pamuk ve ipek malzemeleri hidrofilik peptidlerin zenginleştirilmesi için kullanılabilen hidrofilik yüzeye sahip malzemelerdir. Bu malzemeler üzerinde gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarında, peptidlerin karboksil ya da hidroksil grupları üzerinden malzemelerin hidrofilik kısımlarına tutunmaları ve ortamdaki tuzlardan arındırılmaları hedeflenerek deney yöntemi geliştirilmiştir. Peptidlerin malzemelere tutunması esnasında ortamdaki asetonitril miktarı fazla tutulurken, desorpsiyon su fazında gerçekleştirilmiştir. Yürütülen çalışmalarda, ipek hedef peptidi 175 kat zenginleştirirken, pamuğun kullanıldığı yöntemde bu peptid 500 kat zenginleştirebilmiştir (Şekil 3.16., şekil 3.17.). Dolayısı ile her iki malzemenin de yüksek zenginleştirme faktörüne sahip olduklarından dolayı ubikitine olmuş peptidlerin düşük miktarlarının zenginleştirilmesi ve takiben LC-MS ile analizlerinde kullanılmasının mümkün olabileceği önerilmektedir. Pamuğa ve ipeğe ait ekte verilen SEM görüntüleri karşılaştırıldığında, pamuk liflerinin, peptidlerin tutunmaları için ipeğe göre daha geniş yüzey alanına sahip oldukları anlaşılmaktadır. Adsorbanlar üzerinde

gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarında, yüzey gözenek, boyut ve şekil özelliklerinin peptid zenginleştirme kapasitesi üzerinde etkili olduğu söylenebilir.



Şekil 3.16. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin ipek ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen hedef peptid sinyalinin ve (B) zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.



Şekil 3.17. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin pamuk ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen hedef peptid sinyalinin ve (B) zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.

3.3.5 Poli-L-Lizin, Poli-L-Arjinin, Poli-L-Ornitin İçeren Sol-Jel Malzemeleri İle Zenginleştirme

3.3.5.1 Poli-L-Lizin, Poli-L-Arjinin, Poli-L-Ornitin İçeren Sol-Jel Malzemelerinin Sentezi

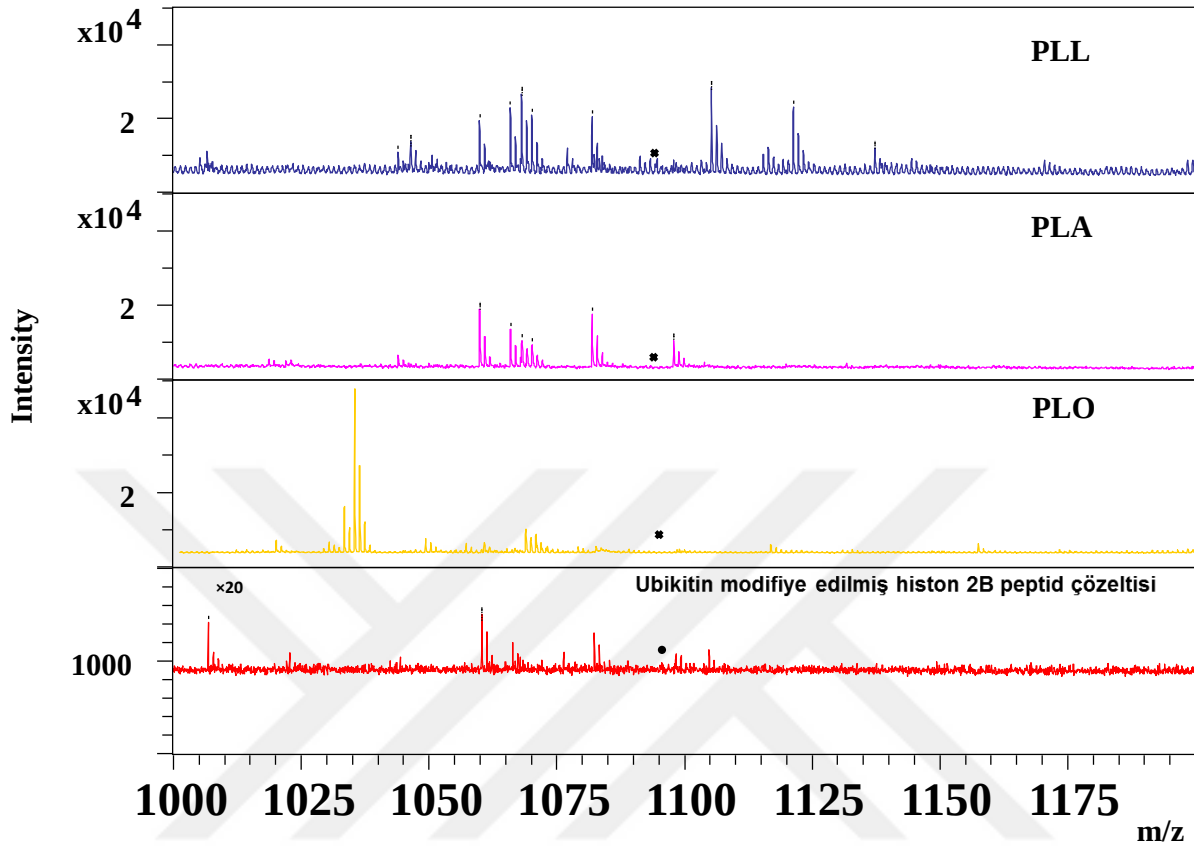
Tetrametilortosilikat (1.5 mL), 340 μ L su, 22 μ L 0.04 M hidroklorik asit bir kap içerisine alınmış ve çalkamalı su banyosunda 20 dakika kadar karıştırılmıştır. Poli-L-lizin (L-arjinin ya da L-ornitin) (5 mg) tartıldıktan sonra 300 μ L 50 mM Tris-HCl (pH=7.0) tamponu içerisinde çözülerek kap içerisindeki çözeltiye ilave edilmiştir. Çözelti, çalkamalı su banyosunda 25 °C'ta bir gece boyunca inkübe edilmiştir.

Jelleşme gözlenince bir spatül yardımı ile ıslak jel temiz bir kap içerisine aktarılıp vakum etüvünde (15 milibar, 40 °C, Memmert Oven, Germany) kurutulmuştur. Kullanmadan önce etanol-su karışımı ile jeller yıkanmıştır.

3.3.5.2. Poli-L-Lizin, Poli-L-Arjinin, Poli-L-Ornitin İçeren Sol-Jel Malzemeleri İle Zenginleştirme Yöntemi

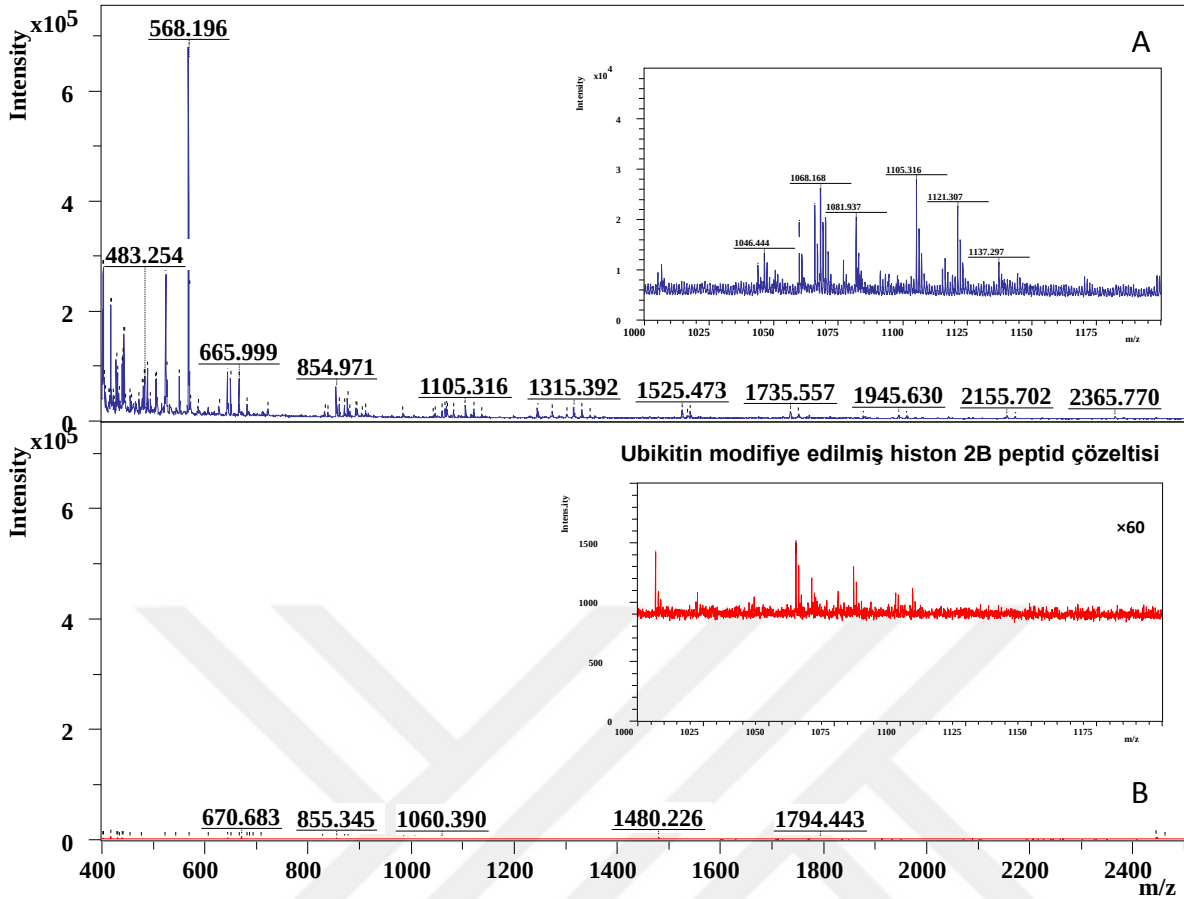
Sentezlenen sol jel malzemeleri ilk olarak 100 mM amonyum asetat tamponu (pH=5.05) içerisinde yıkanarak malzeme içindeki safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Yüzeyler, üzerine 100 mM amonyum asetat tampon çözeltisi ile birlikte tripsin enzimi ile parçalanmış ubikitinasyona uğramış 1 µg/µL derişiminde Histon 2B peptid çözeltisinden 5 µL eklenerek oda sıcaklığında yarım saat süresince inkübe edilmiştir. Aynı tampon çözeltisiyle yıkama işlemleri yapılmıştır. Son olarak malzemeler üzerine 20 µL su:asetonitril (1:1, v/v %1.0 TFA içeren) çözeltisi ve 5 µL trifloroasetik asit eklenerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elüe edilen numuneler, α-siyano-4-hidroksi sinnamik asit çözeltisi (1:1, v/v) ile karıştırılarak MALDI-ToF-MS ile analiz edilmiştir.

3.3.5.3. Poli-L-Lizin, Poli-L-Arjinin, Poli-L-Ornitin İçeren Sol-Jel Malzemeleri İle Zenginleştirme Verileri ve Sonuçları



Şekil 3.18. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin PLL, PLA, PLO immobilize sol-jeller ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve zenginleştirme öncesi elde edilen sinyallerin karşılaştırıldığı MALDI-TOF-MS spektrumları.

PLL, PLA ve PLO içeren sol-jeller üzerinde yapılan zenginleştirme çalışmalarında, pH=5.0 değerinde peptidler yüzeyle inkübe edildikten sonra, pH değeri 1'e düşürülerek peptidler desorbe edilmiştir. pH=5.0 değerinde PLL, PLA, PLO içeren sol-jeller pozitif yüklü amin gruplarına sahiptir. Peptidler ise bu ortamda negatif yüklü karboksil uçları içerirler. Yani, peptidler karboksil uçları üzerinden malzemelere tutunur. Ortam pH değeri 1'e çekildiğinde peptidlerin karboksil grupları da nötral hale geleceğinden dolayı, peptidler malzeme üzerinden desorbe olurlar.



Şekil 3.19. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin PLL immobilize sol-jel ile zenginleştirilmesinden elde edilen ve (B) zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.

Yapılan zenginleştirme çalışmasında PLL içeren sol-jel, hedef peptidin zenginleştirilmesinde çok az da olsa kullanılabileceğini göstermiştir (Şekil 3.19.). Ancak PLA ve PLO içeren sol-jeller ile yürütülen çalışmalar sonrasında hedef peptid sinyalini uygun bir şekilde arttırdığını gösteren sonuçlar elde edilememiştir (Şekil 3.18.).

Ubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidi parçalanma ürünleri için, sülfonil fonksiyonel grubuna sahip yüzeyde gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmasında hedef peptidin 750 kat zenginleştirildiği, zirkonyum temelli metalle gerçekleştirilen çalışmada 35 kat zenginleştirildiği, ipeğin hedef peptidi 175 kat zenginleştirdiği, pamuğun kullanıldığı yöntemde bu peptidin 500 kat zenginleştirildiği, PLL içeren sol-jel kullanıldığında ise hedef peptidin zenginleştirilmesinin çok az da olsa

sağlanabildiği görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, hedef peptid kütle spektrometrik olarak gözlenebilir ve tanımlanabilir sınırlara getirilmiştir. Adsorbanların hedef peptide yönelik seçicilikleri düşüktür fakat LC-MS ile yapılacak ayırma işlemleri ile bu peptid diğer peptidlerden ayrılacak ve zenginleştirilmesi sağlanabildiği için kolaylıkla analiz edilebilecektir. Dolayısıyla, hücre lizatları üzerinde uygulanan proteomiks çalışmalarında, tripsin parçalaması ile elde edilecek çok sayıda peptidin bulunduğu karmaşık bir ortamda bu adsorbanların kullanılması ile gerçekleştirilecek bir zenginleştirmenin ardından LC-MS ile gerçekleştirilecek ayırma ve analiz işlemlerini takiben ubikitinasyona uğramış peptidlerin tayini mümkün olacaktır.



4. SONUÇLAR

4.1. Bölüm 1 İçin Sonuçlar

Yapılan analizler sonucunda referans biyomoleküllere ait spektrumlardaki peptit sinyallerinin yorumlanması ile ubiquitinasyon postranslasyonel modifikasyonun kütle spektrometrik olarak izlenmesinin mümkün olduğu tespit edilmiştir.

- Histon 2B peptidinin tripsin enzimi aracılığı ile enzimatik parçalamaya uğratıldıktan sonra YTSSK peptidine ve AVSEGTK peptidine ait sinyaller gözlenmiştir. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidi tripsin enzimi aracılığı ile enzimatik parçalamaya uğratıldığında YTSSK peptidine ait sinyal gözlenmemektedir. Bunun sebebi, ubiquitin sonundaki glisin lizinin yan zincirindeki NH_2 grubuna bağlanmasıyla o bölgeyi tripsin enziminin yaklaşamayacağı şekilde bloke etmesi ve lizinin C terminalindeki peptid bağından gerçekleşecek triptik parçalanmanın engellenmesidir. Histon 2B peptidindeki ubiquitinasyona uğramamış AVSEGTK' daki lizinin C terminalindeki peptid bağından ise tripsin ile parçalama gerçekleşeceğinden parçalama sonrası elde edilmesi beklenen bu peptide ait sinyal gözlenmeye devam etmektedir.
- Histon 2B peptidinin ubiquitin proteini ile ubiquitinasyon mekanizmasında rol alan enzimlerin bulunmadığı bir ortamda inkübe edilmesi sonrasında gerçekleştirilen enzimatik parçalama sonucunda hem YTSSK dizilimine ait 585. 2879 kütleli hem de AVSEGTK dizilimine ait 733.3727 kütleli sinyaller görülmektedir. Çünkü ortamda ubiquitinasyonu sağlayıcı E1, E2 ve E3 enzimlerinin bulunmaması nedeniyle peptit üzerindeki herhangi bir lizin üzerinde ubiquitinasyon gerçekleşmesi beklenmez ve bu durumdan dolayı tripsin enzimi Histon 2B peptidi üzerindeki lizinlerin bazik yan zincirlerinden yaklaşılarak C terminalindeki peptid bağından parçalama yapar.
- Sıcaklık artırıldığında, inkübasyon sonrasında gerçekleştirilen enzimatik parçalama ile elde edilen spektrumda yukarıda bahsedilen her iki peptide ait sinyallere rastlanmamaktadır. Bu durum sıcaklık etkisiyle gerçekleşmiş olabilecek özgün olmayan ubiquitin bağlanmalarını işaret etmektedir.

4.2. Bölüm 2 İçin Sonuçlar

- Ubikitinasyona uğramış proteinleri ve peptitleri belirlemek amacıyla HCT116, RKO and A375 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen proteomiks çalışmalarına ait very analizi sonuçlarına göre toplamda 5184 protein tanımlanırken, ubikitinasyona uğramış protein sayısı 46 olarak tespit edildi (33 monoubikitinasyona uğramış protein, 9 diubikitinasyona uğramış protein ve 4 poliubikitinasyona uğramış protein). 13 proteinin anlamlı olarak ubikitinasyona uğradığı istatistiki olarak (p değeri < 0.05) tespit edildi. Canlı hücre proteomunda ölü hücrelere göre daha fazla ubikitinasyona uğramış protein olduğu görüldü.
- 59887 peptit arasından 98 tanesinin ubikitinasyona uğradığı görüldü. Canlı hücrelerde 75, ölü hücrelerde ise 50 tane ubikitinasyona uğramış peptit tespit edildi. Yine canlı hücrelerdeki ubikitinasyona uğrayan peptit yoğunluğunun ölü hücrelere göre daha fazla olduğu gözlemlendi. 9 tane peptidin canlı ve ölü hücreler arasında anlamlı bir şekilde farklılık gösterdiği tespit edildi. Bu peptitlerin doluluk oranları hesaplandı. Genel olarak, ubikitinasyona uğramış peptit doluluk oranının canlı hücrelerde ölü hücrelere göre daha fazla olduğu söylenebilir.
- UHRF1_3 siRNA ve UHRF1_4 siRNA' ları, RKO hücrelerinin canlılığında zamandan bağımsız bir şekilde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Zaman içerisinde hücre ölümünde ciddi bir artış gözlenmemektedir.
- UHRF1_3 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığında % 44 azalış görülmüştür. UHRF1_4 siRNA verilmiş örneklerdeki hücre canlılığında ise % 26 azalış gözlenmiştir. Bu nedenle UHRF1 'in kolon kanseri tedavisinde potansiyel ilaç hedefi olabileceği belirlenmiştir.
- Yapılan çalışmalar, UHRF1 siRNA' larının RKO hücrelerinin 5FU ilacına karşı hassasiyetini artırdığını göstermiştir. MTX ve PCTL ilaçlarına karşı ise hücre hassasiyetini aşağı yukarı arttırdığı söylenebilir.
- UHRF1 siRNA transfeksiyonu yapılmış RKO hücreleri üzerinde gerçekleştirilen etiketsiz proteomiks çalışması sonucunda, 4600 protein tanımlanmıştır ve bu proteinlerden 3229 tanesi bütün örneklerde ortak olarak bulunmaktadır.

UHRF1, 20 peptit üzerinden tanımlanmıştır ve siRNA' lar ile muamele edilen hücrelerde en çok azalarak düzenlenen protein olarak bulunmuştur. Bu durum, UHRF1 siRNA' larının UHRF1' e özgü olduğunu ispatlamaktadır. Bütün örneklerde toplamda 30 tane ubikitinasyona uğramış protein tayin edilebilmiştir.

- siRNA transfeksiyonu yapılmış RKO ve kontrol RKO hücrelerinden gelen proteinler üzerinde gerçekleştirilen proteomik çalışmaları sonucunda, elde edilen peptitler üzerinde yürütülen immünoafinite çöktürmesi ile gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarından sonra tespit edilen ubikitinasyona uğramış proteinlerin sayısında 20 kat artış gözlenmiştir.
- Protein düzeyinde yapılan analizler sonucunda, tüm örnekler için varyasyon katsayısı (Coefficient of variation, CV, standart sapmanın ortalamaya göre % değişimi) %10' dan küçük olacak şekilde 216 tane tekrarlanabilir protein belirlendi. UHRF1 siRNA' ları ile inkübe edildikten sonra zenginleştirilen örnekler siRNA ile inkübe edilmeden zenginleştirilen kontrol örnekleri ile kıyaslandığında ubikitinasyona uğrayan 3 tane proteinin miktarının iki kat arttığı, 5 proteinin ise miktarının yarıya düştüğü belirlenmiştir. Kontrol örnekleri hariç tutulduğunda, sadece siRNA inkübasyonunun ardından zenginleştirilmiş örneklerde tayin edilen ubikitinasyona uğramış protein sayısı ise 8 tane olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, UHRF1' in miktarının azalarak düzenlenmesinin hücrede ubikitinasyona uğramış protein sayısını azalttığını göstermektedir.
- Tüm örnekler için 1551 tane ubikitinasyona uğramış peptit tanımlandı. Bu peptitler arasında varyasyon katsayısı % 20' den küçük olacak şekilde 589 tane tekrarlanabilir peptit belirlendi. UHRF1 siRNA' ları ile inkübe edildikten sonra zenginleştirilen örnekler siRNA ile inkübe edilmeden zenginleştirilen kontrol örnekleri ile kıyaslandığında ubikitinasyona uğrayan 17 tane peptit miktarının iki kat arttığı, 11 peptidin ise miktarının yarıya düştüğü belirlenmiştir. Kontrol örnekleri hariç tutulduğunda, sadece siRNA inkübasyonunun ardından zenginleştirilmiş örneklerde tayin edilen ubikitinasyona uğramış peptit sayısı ise 156 tane olarak hesaplanmıştır ve bu peptitlerin 54 tanesinin CV değeri % 20' nin altındadır. Bu değerler, UHRF1' in miktarının azalarak düzenlenmesinin hücrede ubikitinasyona uğramış peptit sayısını azalttığını göstermektedir.

4.3. Bölüm 3 İçin Sonuçlar

- Ubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidi parçalanma ürünlerinin sülfonil fonksiyonel grubuna sahip yüzey üzerinde gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmasında, hedef peptidin 750 kat zenginleştirildiği görülmüştür.
- Ubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidi parçalanma ürünleri için zirkonyum immobilize metalle gerçekleştirilen çalışmada ubikitinasyona uğramış peptid 35 kat zenginleştirilmiştir.
- Ubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidi parçalanma ürünlerinin ipek ve pamuk kullanılarak zenginleştirilmesi deneyleri sonucunda, ipek hedef peptidi 175 kat zenginleştirirken, pamuğun kullanıldığı yöntemde bu peptid 500 kat zenginleştirebilmiştir.
- Ubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidi parçalanma ürünlerinin zenginleştirilmesi için PLL içeren sol-jel kullanıldığında, hedef peptidin zenginleştirilmesi çok az da olsa sağlanabilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda, hedef peptid kütle spektrometrik olarak gözlenebilir ve tanımlanabilir sınırlara getirilmiştir. Dolayısıyla, hücre lizatları üzerinde uygulanan proteomiks çalışmalarında, tripsin parçalaması ile elde edilecek çok sayıda peptidin bulunduğu karmaşık bir ortamda bu adsorbanların kullanılması ile gerçekleştirilecek bir zenginleştirmenin ardından LC-MS ile gerçekleştirilecek ayırma ve analiz işlemlerini takiben ubikitinasyona uğramış peptidlerin tayini mümkün olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Xu, G., Jaffrey, S. R., Proteomic identification of protein ubiquitination events, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 29, 73-109, **2013**.
- [2] Ciechanover, A., Ben-Saadon, R., N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in, *Trends in cell biology*, 14, 103-106, **2004**.
- [3] Chen, Y.-S., Qiu, X.-B., Ubiquitin at the crossroad of cell death and survival, *clinic*, 12, 15-17, **2013**.
- [4] Kannicht, C., *Posttranslational Modification of Proteins: Tools for Functional Proteomics* vol. 194: Springer Science & Business Media, 2002.
- [5] Udeshi, N. D., Mertins, P., Svinkina, T., Carr, S. A., Large-scale identification of ubiquitination sites by mass spectrometry, *Nature protocols*, 8, 1950-1960, **2013**.
- [6] Nielsen, M. L., Savitski, M. M., Zubarev, R. A., Improving protein identification using complementary fragmentation techniques in Fourier transform mass spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 835-845, **2005**.
- [7] Milardi, D., Grande, G., Vincenzoni, F., Castagnola, M., Marana, R., Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology, *Molecular reproduction and development*, 80, 350-357, **2013**.
- [8] Thelen, J. J., Miernyk, J. A., The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us, *Biochemical Journal*, 444, 169-181, **2012**.
- [9] Grotenbreg, G., Ploegh, H., Chemical biology: dressed-up proteins, *Nature*, 446, p.993, **2007**.
- [10] Geiss-Friedlander, R., Melchior, F., Concepts in sumoylation: a decade on, *Nature reviews Molecular cell biology*, 8, p.nrm2293, **2007**.
- [11] Morrison, R. S., Kinoshita, Y., Johnson, M. D., Uo, T., Ho, J. T., McBee, J. K., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Proteomic analysis in the neurosciences, *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 553-560, **2002**.
- [12] Chicooree, N., Griffiths, J. R., Connolly, Y., Tan, C. T., Malliri, A., Evers, C. E., Smith, D. L., A novel approach to the analysis of SUMOylation with the

- independent use of trypsin and elastase digestion followed by database searching utilising consecutive residue addition to lysine, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 127-134, **2013**.
- [13] Herrmann, J., Lerman, L. O., Lerman, A., Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation, *Circulation research*, 100, 1276-1291, **2007**.
- [14] Akutsu, M., Dikic, I., Bremm, A., Ubiquitin chain diversity at a glance, *J Cell Sci*, 129, 875-880, **2016**.
- [15] Hoeller, D., Hecker, C.-M., Dikic, I., Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis, *Nature Reviews Cancer*, 6, p.776, **2006**.
- [16] Hoeller, D., Dikic, I., Targeting the ubiquitin system in cancer therapy, *Nature*, 458, p.438, **2009**.
- [17] Spataro, V., Norbury, C., Harris, A., The ubiquitin-proteasome pathway in cancer, *British journal of cancer*, 77, p.448, **1998**.
- [18] Cole, G. M., Timiras, P. S., Ubiquitin-protein conjugates in Alzheimer's lesions, *Neuroscience letters*, 79, 207-212, **1987**.
- [19] Giasson, B. I., Lee, V. M.-Y., Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease?, *Cell*, 114, 1-8, **2003**.
- [20] Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S.-i., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase, *Nature genetics*, 25, p.302, **2000**.
- [21] Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S., Selkoe, D. J., Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease, *Science*, 293, 263-269, **2001**.
- [22] Herrmann, J., Ciechanover, A., Lerman, L. O., Lerman, A., The ubiquitin–proteasome system in cardiovascular diseases—a hypothesis extended, *Cardiovascular research*, 61, 11-21, **2004**.
- [23] Powell, S. R., Herrmann, J., Lerman, A., Patterson, C., Wang, X., The ubiquitin–proteasome system and cardiovascular disease, *Progress in molecular biology and translational science*, Elsevier 295-346, **2012**.
- [24] Ahmed, N., Zeng, M., Sinha, I., Polin, L., Wei, W.-Z., Rathinam, C., Flavell, R., Massoumi, R., Venuprasad, K., The E3 ligase Itch and deubiquitinase Cyld act

- together to regulate Tak1 and inflammation, *Nature immunology*, 12, p.1176, **2011**.
- [25] Gerlach, B., Cordier, S. M., Schmukle, A. C., Emmerich, C. H., Rieser, E., Haas, T. L., Webb, A. I., Rickard, J. A., Anderton, H., Wong, W. W.-L., Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling, *Nature*, 471, p.591, **2011**.
- [26] Tokunaga, F., Iwai, K., LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses, *Microbes and infection*, 14, 563-572, **2012**.
- [27] Mann, M., Jensen, O. N., Proteomic analysis of post-translational modifications, *Nature biotechnology*, 21, p.255, **2003**.
- [28] Wilkinson, K. D., Tashayev, V. L., O'Connor, L. B., Larsen, C. N., Kasperek, E., Pickart, C. M., Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T, *Biochemistry*, 34, 14535-14546, **1995**.
- [29] Mori, S., Claessonwelsch, L., Okuyama, Y., Saito, Y., Ligand-induced polyubiquitination of receptor tyrosine kinases, *Biochemical and biophysical research communications*, 213, 32-39, **1995**.
- [30] Jadhav, T., Wooten, M. W., Defining an embedded code for protein ubiquitination, *Journal of proteomics & bioinformatics*, 2, p.316, **2009**.
- [31] Danielsen, J. M., Sylvestersen, K. B., Bekker-Jensen, S., Szklarczyk, D., Poulsen, J. W., Horn, H., Jensen, L. J., Mailand, N., Nielsen, M. L., Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level, *Molecular & Cellular Proteomics*, 10, p.M110. 003590, **2011**.
- [32] Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M. E., Rad, R., Rush, J., Comb, M. J., Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome, *Molecular cell*, 44, 325-340, **2011**.
- [33] Xu, G., Paige, J. S., Jaffrey, S. R., Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling, *Nature biotechnology*, 28, p.868, **2010**.
- [34] Goldknopf, I., Taylor, C. W., Baum, R. M., Yeoman, L. C., Olson, M., Prestayko, A., Busch, H., Isolation and characterization of protein A24, a"

- histone-like" non-histone chromosomal protein, *Journal of Biological Chemistry*, 250, 7182-7187, **1975**.
- [35] Goldknopf, I. L., Busch, H., Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 864-868, **1977**.
- [36] Shanklin, J., Jabben, M., Vierstra, R. D., Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 359-363, **1987**.
- [37] Baboshina, O. V., Haas, A. L., Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 2823-2831, **1996**.
- [38] Gregori, L., Poosch, M. S., Cousins, G., Chau, V., A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis, *Journal of Biological Chemistry*, 265, 8354-8357, **1990**.
- [39] Treier, M., Staszewski, L. M., Bohmann, D., Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the δ domain, *Cell*, 78, 787-798, **1994**.
- [40] Hou, D., Cenciarelli, C., Jensen, J. P., Nguygen, H., Weissman, A. M., Activation-dependent ubiquitination of a T cell antigen receptor subunit on multiple intracellular lysines, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 14244-14247, **1994**.
- [41] Bhat, K. P., Truax, A. D., Greer, S. F., Phosphorylation and ubiquitination of degron proximal residues are essential for class II transactivator (CIITA) transactivation and major histocompatibility class II expression, *Journal of Biological Chemistry*, 285, 25893-25903, **2010**.
- [42] Pickart, C. M., Mechanisms underlying ubiquitination, *Annual review of biochemistry*, 70, 503-533, **2001**.
- [43] Sokalingam, S., Raghunathan, G., Soundrarajan, N., Lee, S.-G., A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein, *PLoS One*, 7, p.e40410, **2012**.
- [44] Bustos, D., Bakalarski, C. E., Yang, Y., Peng, J., Kirkpatrick, D. S., Characterizing ubiquitination sites by peptide-based immunoaffinity enrichment, *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, 1529-1540, **2012**.

- [45] Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., Gygi, S. P., A proteomics approach to understanding protein ubiquitination, *Nature biotechnology*, 21, p.921, **2003**.
- [46] Denis, N. J., Vasilescu, J., Lambert, J. P., Smith, J. C., Figeys, D., Tryptic digestion of ubiquitin standards reveals an improved strategy for identifying ubiquitinated proteins by mass spectrometry, *Proteomics*, 7, 868-874, **2007**.
- [47] Esteban Warren, M. R., Parker, C. E., Mocanu, V., Klapper, D., Borchers, C. H., Electrospray ionization tandem mass spectrometry of model peptides reveals diagnostic fragment ions for protein ubiquitination, *Rapid communications in mass spectrometry*, 19, 429-437, **2005**.
- [48] Ogawa, Y., Ono, T., Wakata, Y., Okawa, K., Tagami, H., Shibahara, K., Histone variant macroH2A1. 2 is mono-ubiquitinated at its histone domain, *Biochemical and biophysical research communications*, 336, 204-209, **2005**.
- [49] Cooper, H. J., Heath, J. K., Jaffray, E., Hay, R. T., Lam, T. T., Marshall, A. G., Identification of sites of ubiquitination in proteins: a fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry approach, *Analytical chemistry*, 76, 6982-6988, **2004**.
- [50] Wang, D., Xu, W., McGrath, S. C., Patterson, C., Neckers, L., Cotter, R. J., Direct identification of ubiquitination sites on ubiquitin-conjugated CHIP using MALDI mass spectrometry, *Journal of proteome research*, 4, 1554-1560, **2005**.
- [51] Cotter, R. J., Ilchenko, S., Wang, D., Gundry, R., Tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometry and proteomics, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 53, 7-17, **2005**.
- [52] Wang, D., Kalume, D., Pickart, C., Pandey, A., Cotter, R. J., Identification of protein ubiquitylation by electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sulfonated tryptic peptides, *Analytical chemistry*, 78, 3681-3687, **2006**.
- [53] Marotti, L. A., Newitt, R., Wang, Y., Aebersold, R., Dohlman, H. G., Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry, *Biochemistry*, 41, 5067-5074, **2002**.

- [54] Maine, G. N., Gluck, N., Zaidi, I. W., Burstein, E., Bimolecular affinity purification (BAP): tandem affinity purification using two protein baits, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009, p.pdb. prot5318, **2009**.
- [55] Jeon, H. B., Choi, E. S., Yoon, J. H., Hwang, J. H., Chang, J. W., Lee, E. K., Choi, H. W., Park, Z.-Y., Yoo, Y. J., A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart, *Biochemical and biophysical research communications*, 357, 731-736, **2007**.
- [56] Kirkpatrick, D. S., Weldon, S. F., Tsapralis, G., Liebler, D. C., Gandolfi, A. J., Proteomic identification of ubiquitinated proteins from human cells expressing His-tagged ubiquitin, *Proteomics*, 5, 2104-2111, **2005**.
- [57] Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L., Kaiser, P., Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry, *Journal of proteome research*, 7, 4566-4576, **2008**.
- [58] Peng, J., Cheng, D., Proteomic analysis of ubiquitin conjugates in yeast, *Methods in enzymology*, 399, 367-381, **2005**.
- [59] Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., Kaiser, P., A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking, *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 737-748, **2006**.
- [60] Beckett, D., Kovaleva, E., Schatz, P. J., A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation, *Protein Science*, 8, 921-929, **1999**.
- [61] Franco, M., Seyfried, N. T., Brand, A. H., Peng, J., Mayor, U., A novel strategy to isolate ubiquitin conjugates reveals wide role for ubiquitination during neural development, *Molecular & Cellular Proteomics*, 10, p.M110. 002188, **2011**.
- [62] Oshikawa, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Nakayama, K. I., Proteome-wide identification of ubiquitylation sites by conjugation of engineered lysine-less ubiquitin, *Journal of proteome research*, 11, 796-807, **2011**.
- [63] Ota, K., Kito, K., Iemura, S. i., Natsume, T., Ito, T., A parallel affinity purification method for selective isolation of polyubiquitinated proteins, *Proteomics*, 8, 3004-3007, **2008**.

- [64] Haas, A. L., Bright, P., The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates, *Journal of Biological Chemistry*, 260, 12464-12473, **1985**.
- [65] Fujimuro, M., Sawada, H., Yokosawa, H., Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins, *FEBS letters*, 349, 173-180, **1994**.
- [66] Fujimuro, M., Sawada, H., Yokosawa, H., Dynamics of ubiquitin conjugation during heat-shock response revealed by using a monoclonal antibody specific to multi-ubiquitin chains, *The FEBS Journal*, 249, 427-433, **1997**.
- [67] Takada, K., Hirakawa, T., Yokosawa, H., Okawa, Y., Taguchi, H., Ohkawa, K., Isolation of ubiquitin-E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) complexes from erythroleukaemia cells using immunoaffinity techniques, *Biochemical Journal*, 356, p.199, **2001**.
- [68] Matsumoto, M. L., Wickliffe, K. E., Dong, K. C., Yu, C., Bosanac, I., Bustos, D., Phu, L., Kirkpatrick, D. S., Hymowitz, S. G., Rape, M., K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody, *Molecular cell*, 39, 477-484, **2010**.
- [69] Newton, K., Matsumoto, M. L., Wertz, I. E., Kirkpatrick, D. S., Lill, J. R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S. S., Fellouse, F. A., Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies, *Cell*, 134, 668-678, **2008**.
- [70] Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T., Nakayama, K. I., Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome, *Proteomics*, 5, 4145-4151, **2005**.
- [71] Vasilescu, J., Smith, J. C., Ethier, M., Figeys, D., Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry, *Journal of proteome research*, 4, 2192-2200, **2005**.
- [72] Vasilescu, J., Zweitzig, D. R., Denis, N. J., Smith, J. C., Ethier, M., Haines, D. S., Figeys, D., The proteomic reactor facilitates the analysis of affinity-purified proteins by mass spectrometry: application for identifying ubiquitinated proteins in human cells, *Journal of proteome research*, 6, 298-305, **2006**.

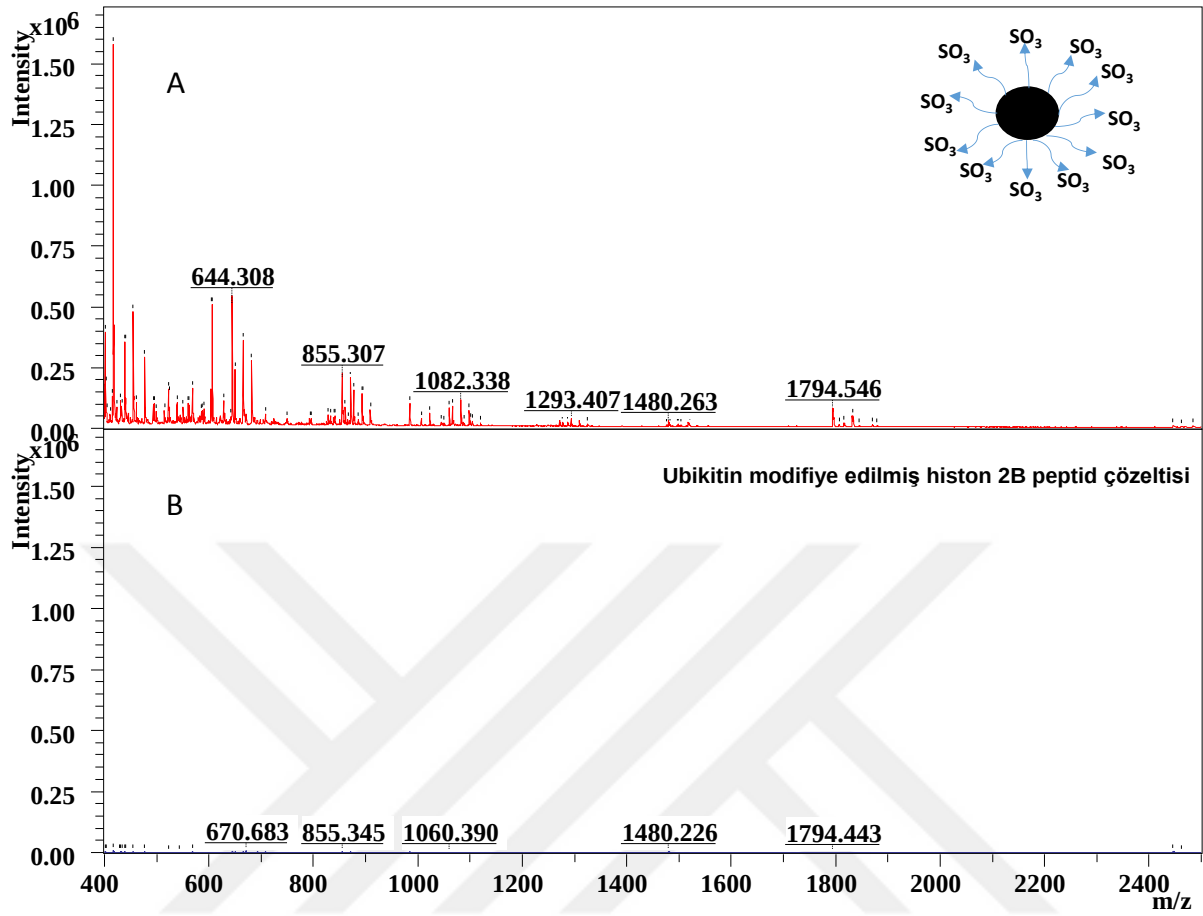
- [73] Haglund, K., Dikic, I., Ubiquitylation and cell signaling, *The EMBO journal*, 24, 3353-3359, **2005**.
- [74] Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M., Rechsteiner, M., Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5461-5467, **1998**.
- [75] Walters, K. J., Kleijnen, M. F., Goh, A. M., Wagner, G., Howley, P. M., Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a, *Biochemistry*, 41, 1767-1777, **2002**.
- [76] Tan, F., Lu, L., Cai, Y., Wang, J., Xie, Y., Wang, L., Gong, Y., Xu, B. e., Wu, J., Luo, Y., Proteomic analysis of ubiquitinated proteins in normal hepatocyte cell line Chang liver cells, *Proteomics*, 8, 2885-2896, **2008**.
- [77] Escribano, M., Antibodies of restricted heterogeneity obtained in rabbits immunized with tetraglycine peptide conjugated to an autologous carrier, *European Journal of Immunology*, 4, 793-798, **1974**.
- [78] Emanuele, M. J., Elia, A. E., Xu, Q., Thoma, C. R., Izhar, L., Leng, Y., Guo, A., Chen, Y.-N., Rush, J., Hsu, P. W.-C., Global identification of modular cullin-RING ligase substrates, *Cell*, 147, 459-474, **2011**.
- [79] Lee, K. A., Hammerle, L. P., Andrews, P. S., Stokes, M. P., Mustelin, T., Silva, J. C., Black, R. A., Doedens, J. R., Ubiquitin ligase substrate identification through quantitative proteomics at both the protein and peptide levels, *Journal of Biological Chemistry*, p.jbc. M111. 248856, **2011**.
- [80] Na, C. H., Jones, D. R., Yang, Y., Wang, X., Xu, Y., Peng, J., Synaptic protein ubiquitination in rat brain revealed by antibody-based ubiquitome analysis, *Journal of proteome research*, 11, 4722-4732, **2012**.
- [81] Udeshi, N. D., Mani, D., Eisenhaure, T., Mertins, P., Jaffe, J. D., Clauser, K. R., Hacohen, N., Carr, S. A., Methods for quantification of in vivo changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition, *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, 148-159, **2012**.
- [82] Wagner, S. A., Beli, P., Weinert, B. T., Nielsen, M. L., Cox, J., Mann, M., Choudhary, C., A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles, *Molecular & Cellular Proteomics*, 10, p.M111. 013284, **2011**.

- [83] Nielsen, M. L., Vermeulen, M., Bonaldi, T., Cox, J., Moroder, L., Mann, M., Iodoacetamide-induced artifact mimics ubiquitination in mass spectrometry, *Nature methods*, 5, p.459, **2008**.
- [84] Wiesner, J., Premisler, T., Sickmann, A., Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications, *Proteomics*, 8, 4466-4483, **2008**.
- [85] Shen, Y., Tolić, N., Xie, F., Zhao, R., Purvine, S. O., Schepmoes, A. A., Moore, R., J, Anderson, G. A., Smith, R. D., Effectiveness of CID, HCD, and ETD with FT MS/MS for degradomic-peptidomic analysis: comparison of peptide identification methods, *Journal of proteome research*, 10, 3929-3943, **2011**.
- [86] Zhang, D., Zhang, D.-E., Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system, *Journal of interferon & cytokine research*, 31, 119-130, **2011**.
- [87] Hori, T., Osaka, F., Chiba, T., Miyamoto, C., Okabayashi, K., Shimbara, N., Kato, S., Tanaka, K., Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8, *Oncogene*, 18, p.6829, **1999**.
- [88] Rabut, G., Peter, M., Function and regulation of protein neddylation, *EMBO reports*, 9, 969-976, **2008**.
- [89] Xirodimas, D. P., Sundqvist, A., Nakamura, A., Shen, L., Botting, C., Hay, R. T., Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway, *EMBO reports*, 9, 280-286, **2008**.
- [90] Hicke, L., Gettin'down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels, *Trends in cell biology*, 9, 107-112, **1999**.
- [91] Andrews, P. S., Schneider, S., Yang, E., Michaels, M., Chen, H., Tang, J., Emkey, R., Identification of substrates of SMURF1 ubiquitin ligase activity utilizing protein microarrays, *Assay and drug development technologies*, 8, 471-487, **2010**.
- [92] Gupta, R., Kus, B., Fladd, C., Wasmuth, J., Tonikian, R., Sidhu, S., Krogan, N. J., Parkinson, J., Rotin, D., Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast, *Molecular systems biology*, 3, p.116, **2007**.

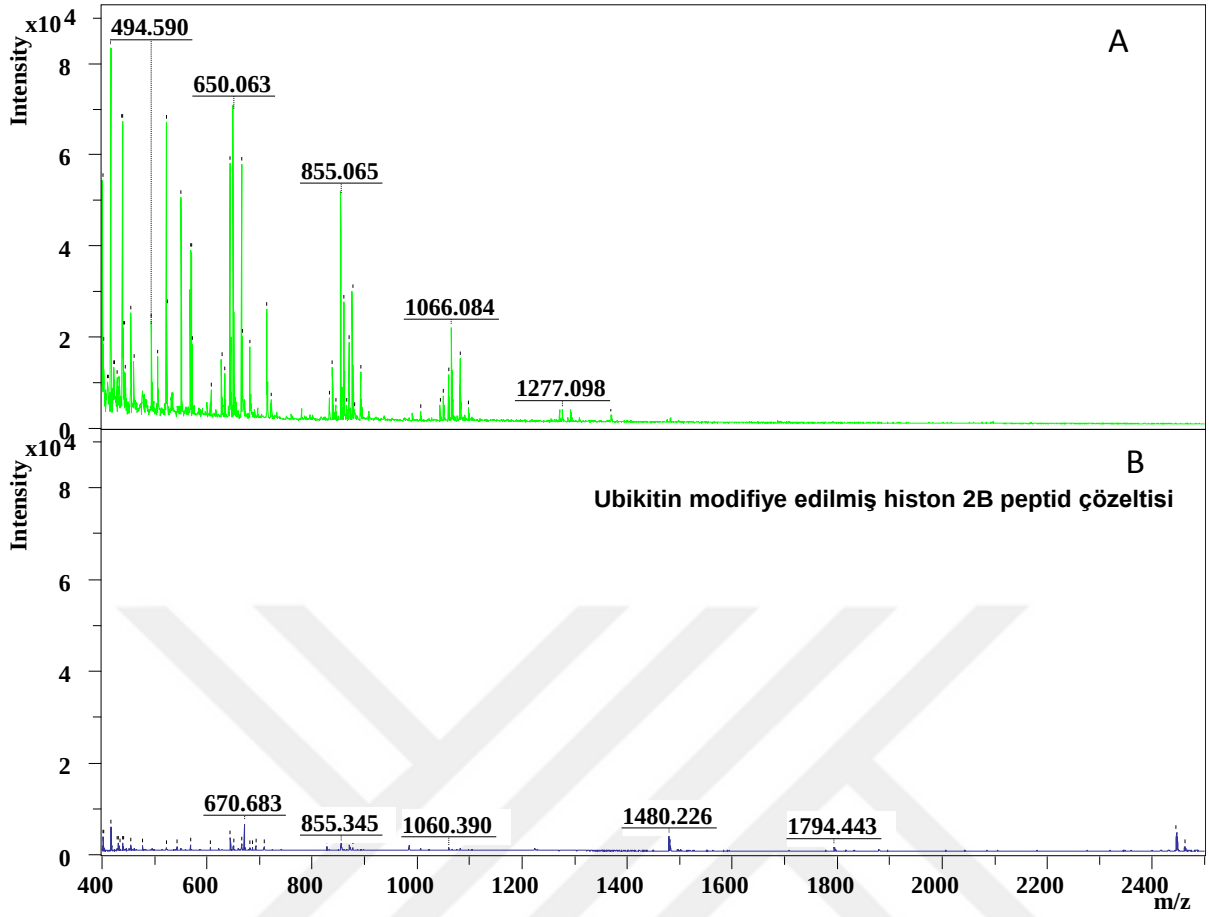
- [93] Loch, C. M., Eddins, M. J., Strickler, J. E., Protein microarrays for the identification of praja1 e3 ubiquitin ligase substrates, *Cell biochemistry and biophysics*, 60, 127-135, **2011**.
- [94] Lu, J.-y., Lin, Y.-y., Qian, J., Tao, S.-c., Zhu, J., Pickart, C., Zhu, H., Functional dissection of a HECT ubiquitin E3 ligase, *Molecular & cellular proteomics*, 7, 35-45, **2008**.
- [95] Burande, C. F., Heuzé, M. L., Lamsoul, I., Monsarrat, B., Uttenweiler-Joseph, S., Lutz, P. G., A label-free quantitative proteomics strategy to identify E3 ubiquitin ligase substrates targeted to proteasome degradation, *Molecular & Cellular Proteomics*, 8, 1719-1727, **2009**.
- [96] Hör, S., Ziv, T., Admon, A., Lehner, P. J., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture and differential plasma membrane proteome quantitation identify new substrates for the MARCH9 transmembrane E3 ligase, *Molecular & Cellular Proteomics*, 8, 1959-1971, **2009**.
- [97] Yen, H.-C. S., Elledge, S. J., Identification of SCF ubiquitin ligase substrates by global protein stability profiling, *Science*, 322, 923-929, **2008**.
- [98] Song, M., Hakala, K., Weintraub, S. T., Shiio, Y., Quantitative proteomic identification of the BRCA1 ubiquitination substrates, *Journal of proteome research*, 10, 5191-5198, **2011**.
- [99] Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., Peng, J., Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation, *Cell*, 137, 133-145, **2009**.
- [100] Argenzio, E., Bange, T., Oldrini, B., Bianchi, F., Peesari, R., Mari, S., Di Fiore, P. P., Mann, M., Polo, S., Proteomic snapshot of the EGF-induced ubiquitin network, *Molecular systems biology*, 7, p.462, **2011**.
- [101] Çelikbıçak, Ö., Atakay, M., Güler, Ü., Salih, B., A novel tantalum-based sol-gel packed microextraction syringe for highly specific enrichment of phosphopeptides in MALDI-MS applications, *Analyst*, 138, 4403-4410, **2013**.
- [102] Çelikbıçak, Ö., Kaynar, G., Atakay, M., Güler, Ü., Kayılı, H. M., Salih, B., Specific enrichment and direct detection of phosphopeptides on insoluble transition metal oxide particles in matrix-assisted laser desorption/ionization

- mass spectrometry applications, *European Journal of Mass Spectrometry*, 19, 151-162, **2013**.
- [103] Dunn, J. D., Reid, G. E., Bruening, M. L., Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry, *Mass spectrometry reviews*, 29, 29-54, **2010**.
- [104] Atakay, M., Çelikbıçak, O. m. r., Salih, B., Amine-functionalized sol–gel-based lab-in-a-pipet-tip approach for the fast enrichment and specific purification of phosphopeptides in MALDI-MS applications, *Analytical chemistry*, 84, 2713-2720, **2012**.
- [105] Zhang, K., Wu, S., Tang, X., Kaiser, N. K., Bruce, J. E., A bifunctional monolithic column for combined protein preconcentration and digestion for high throughput proteomics research, *Journal of Chromatography B*, 849, 223-230, **2007**.
- [106] Kayili, H. M., Barlas, N., Atakay, M., Salih, B., Fast purification of glycans and glycopeptides using silk-packed micropipette tip for matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection analysis, *Microchemical Journal*, 139, 492-499, **2018**.

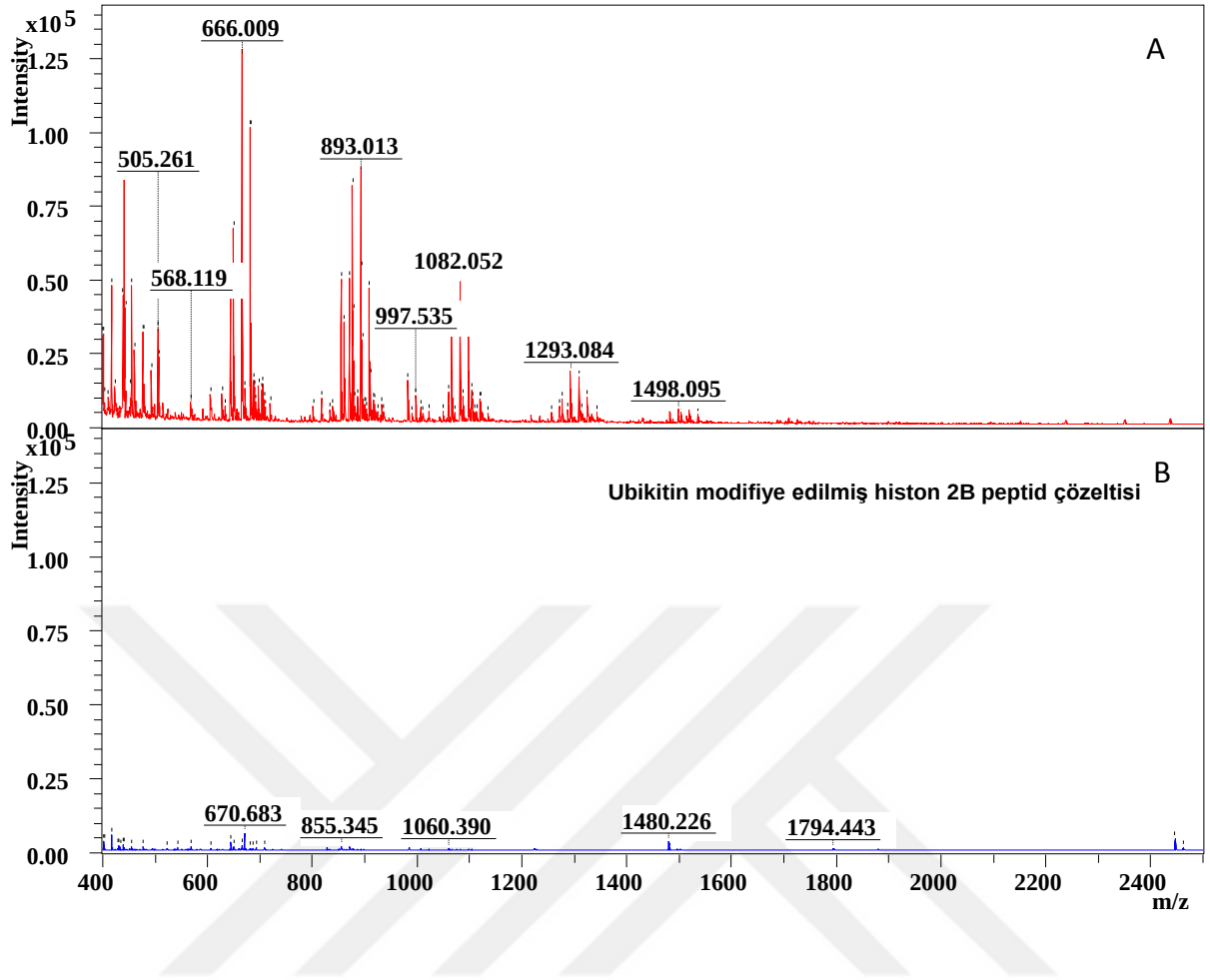
EKLER



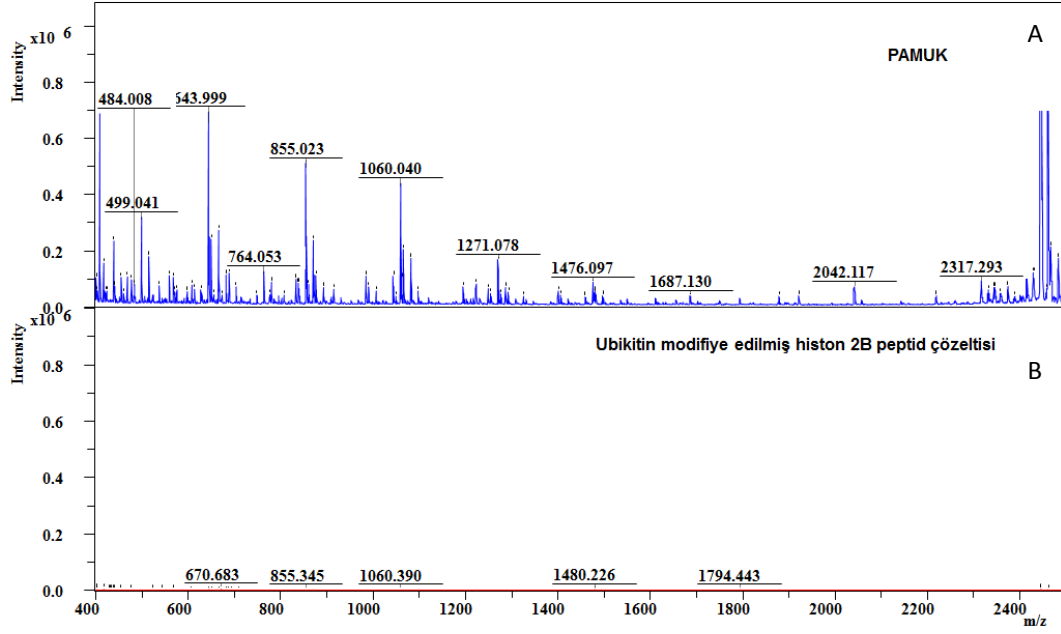
Şekil1. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin sülfonil fonksiyonel grupları içeren malzeme ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS analiz spektrumları.



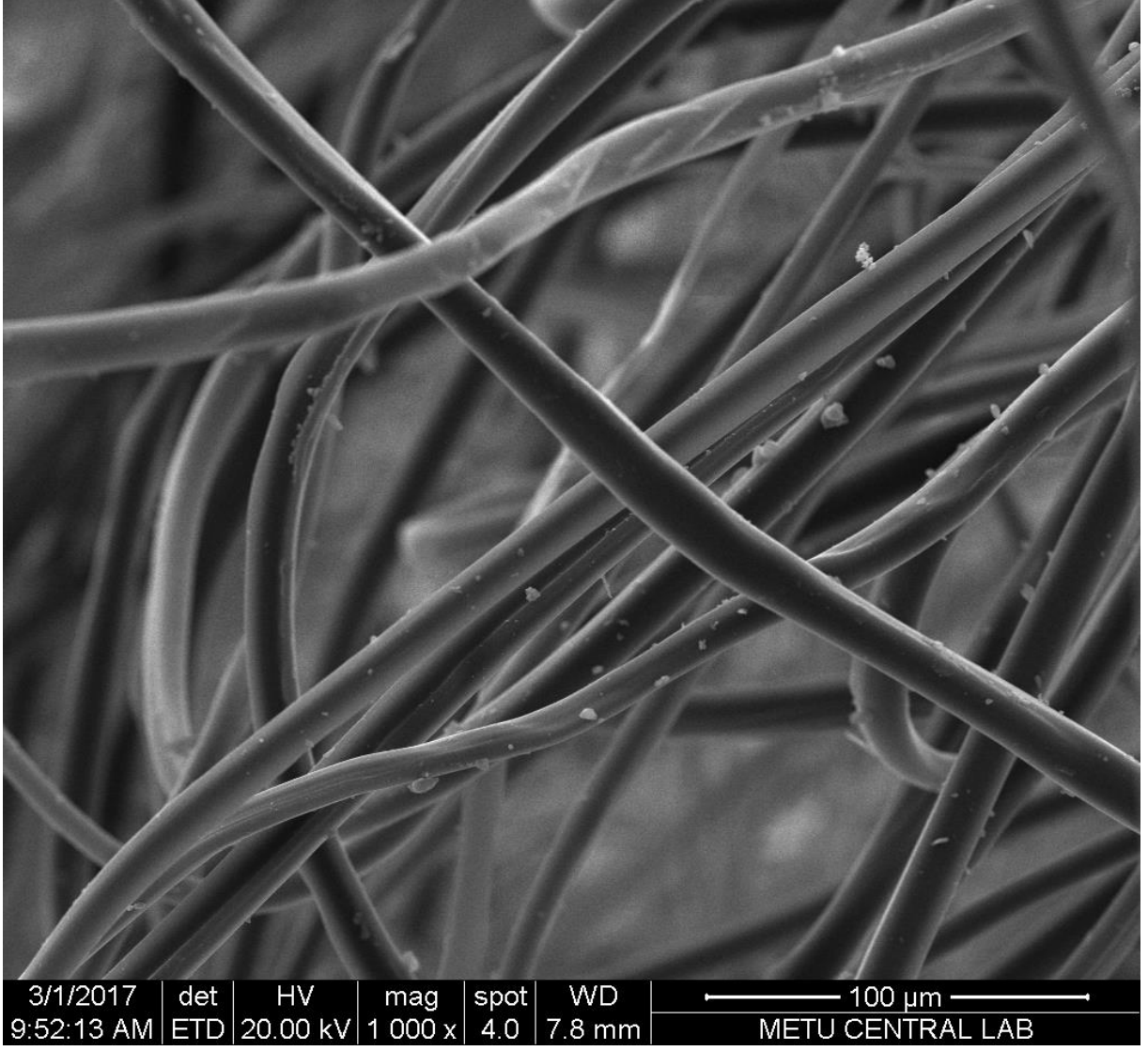
Şekil2. Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin Zr temelli sol-jel ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.



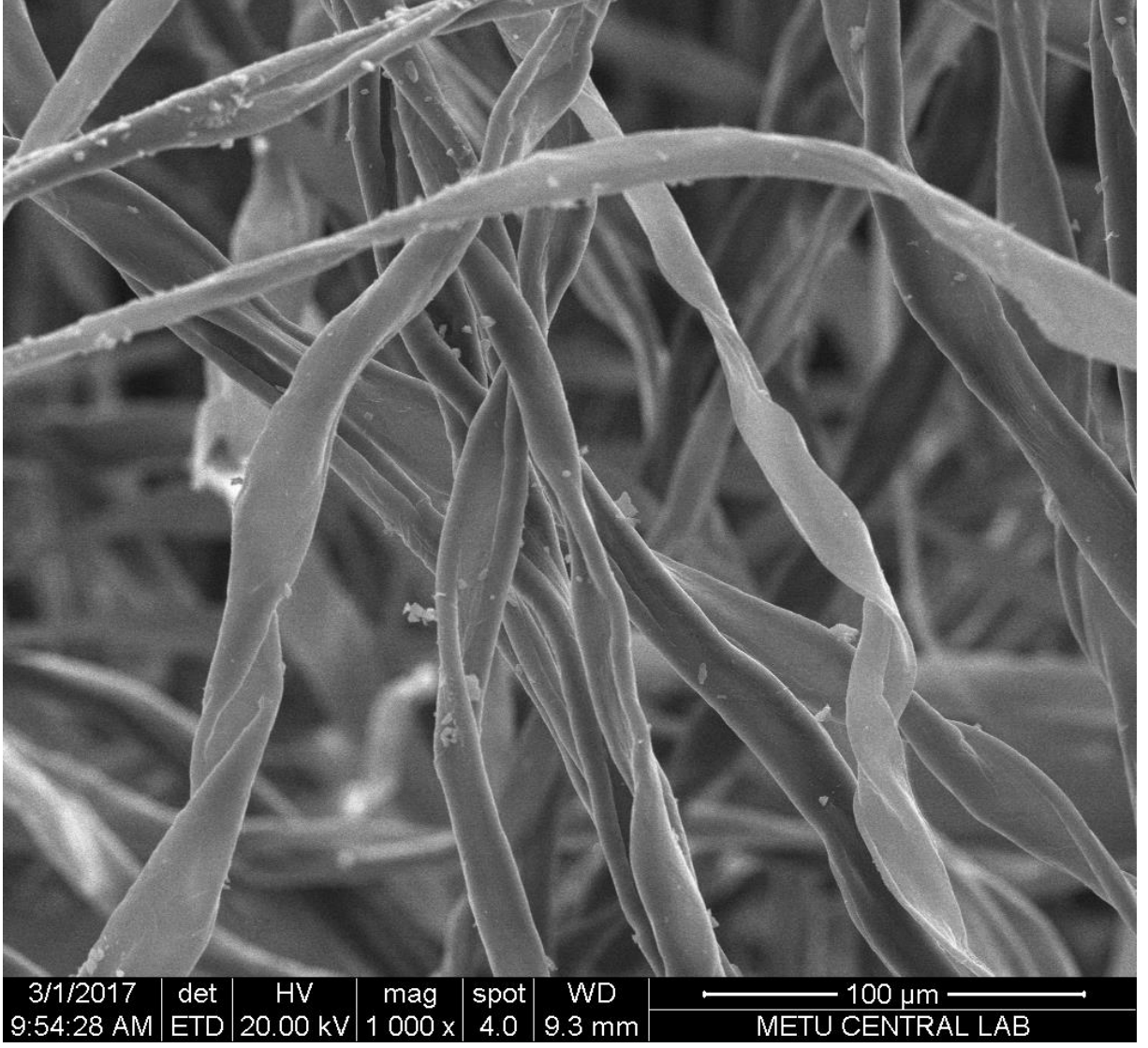
Şekil 3. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin ipek malzemesi ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.



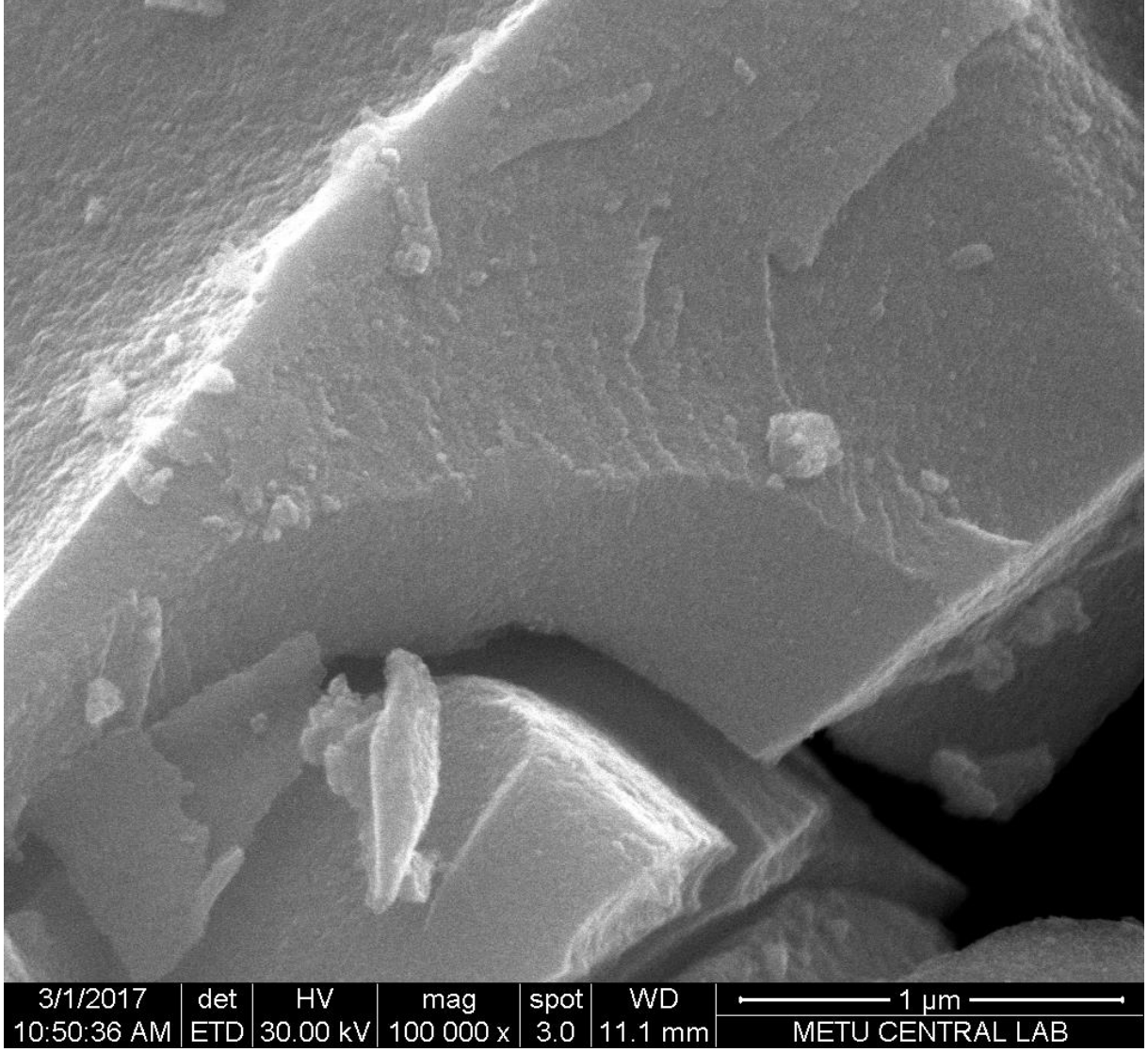
Şekil 4. (A) Monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin pamuk malzemesi ile zenginleştirilmesinin ardından elde edilen ve (B) monoubikitinasyona uğramış Histon 2B peptidinin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirme öncesi elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları.



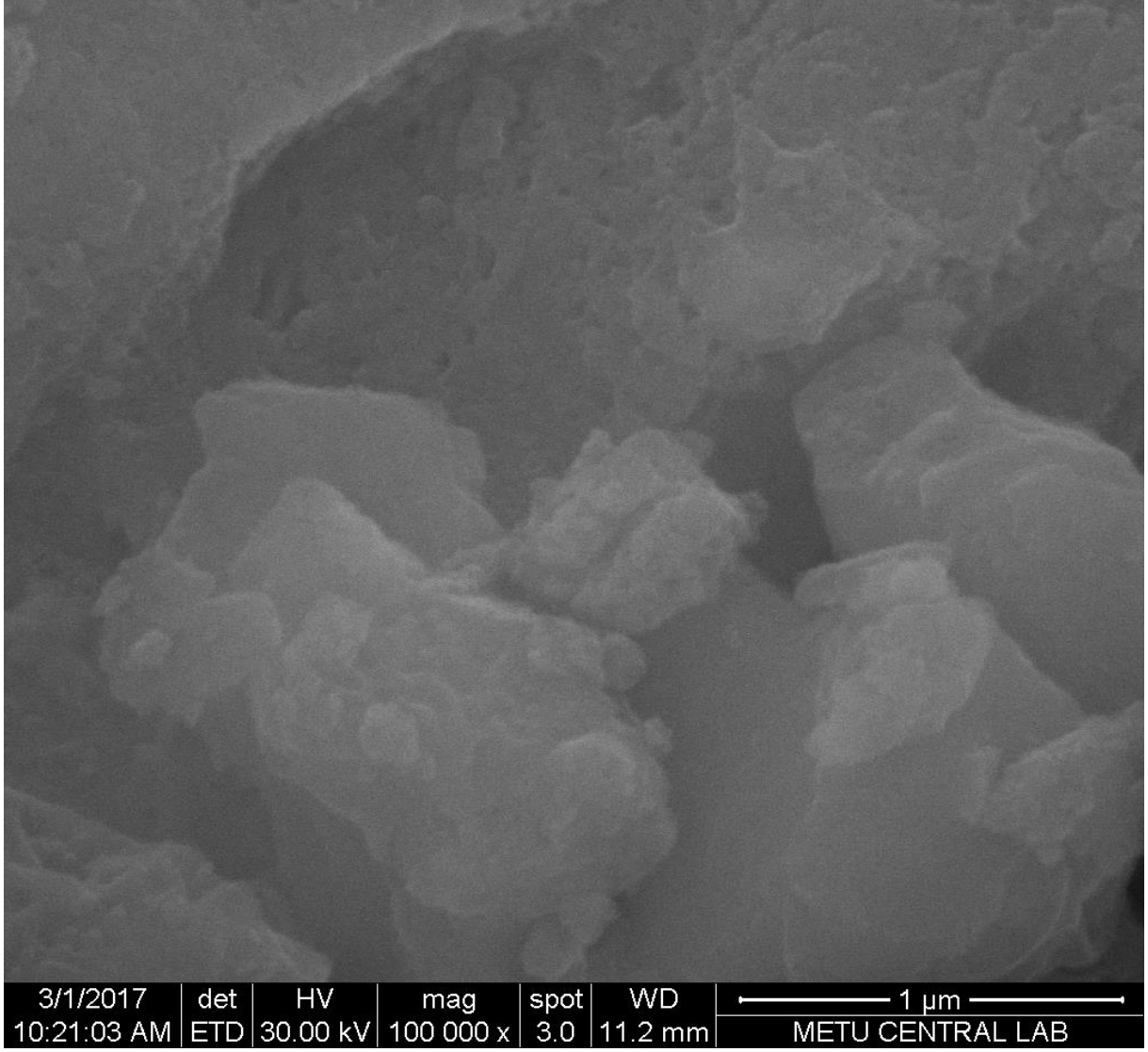
Şekil 5. İpeğe ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü



Şekil 6. Pamuğa ait SEM görüntüsü



Şekil 3. Titanyum temelli Sol-Jele ait SEM görüntüsü



Şekil 4. Zirkonyum temelli Sol-Jele ait SEM görüntüsü

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Ülkü Güler Tokat

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-posta: ulkuguler@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Kimya Bölümü,
Fizikokimya Anabilim Dalı, 06800, Ankara/TÜRKİYE

Eğitim

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya
Anabilim Dalı

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim
Dalı

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce: İyi seviyede

İş Deneyimi

2010- Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Fizikokimya
Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

Deneyim Alanları

Kütle Spektrometrisi, Proteomiks, Aptamer

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

- Dibavar A. S., Sabatier P., Güler Tokat Ü., Chernobrovkin A., Pirmoradian M., and Zubarev R.A., Comparative proteomics of dying and surviving cancer cells improves the identification of drug targets and sheds light on cell life/death decisions, Molecular and Cellular Proteomics, 2018.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Güler Tokat Ü., Dibavar A. S., Zubarev R., Salih B., Kütle Spektrometrik Yöntemlerle Kansere Hücrelerinde Ubikitin Protein Ligazlarının Rollerinin Aydınlatılması (Poster), 2. Ulusal Proteomiks Kongresi, 24-25 Kasım 2017, İstanbul, Türkiye



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 25/06/2018

Tez Başlığı: KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE PROTEİNLERİN UBİKİTİNASYON BÖLGELERİNİN DÜŞÜK DERİŞİMLERDE BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 96 sayfalık kısmına ilişkin, 25/06/2018 tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


Tarih ve İmza
25.06.2018

Adı Soyadı: ÜLKÜ GÜLER TOKAT
Öğrenci No: N12141233
Anabilim Dalı: KİMYA
Programı: DOKTORA
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


(Unvan, Ad Soyad, İmza)